

LUIZ PEREIRA RAMOS

HETEROPOLISSACARÍDEO ÁCIDO
ISOLADO DE OVIDUTO-PRÓSTATA
DE *Megalobulimus paranaguensis*

Tese apresentada à Coordenação de Pós-
Graduação do Departamento de Bioquímica
da Universidade Federal do Paraná, para
obtenção do grau de Mestre em Bioquímica.

CURITIBA
1987

TRABALHO ORIENTADO POR:

Prof. Dr. José Hazencleve Duarte

Prof. Dr. Philip Albert James Gorin

Aos meus pais, mestres em exemplo, incentivo e dedicação. De vocês a melhor orientação: de que o amor é um caminho a ser trilhado com esforço, abertura e generosidade. Saibam, a sede do caminho é intensa ...

SUMÁRIO

Agradecimentos	v
Lista de Figuras	vii
Lista de Tabelas	x
Lista de Esquemas	xi
Lista de Siglas	xii
Resumo	xiv
Summary	xvi
I. INTRODUÇÃO	01
Variações estruturais na periferia de polissacarídeos contendo galactose	02
Principais tipos de núcleos observados em polissacarí- deos contendo galactose	05
Polissacarídeos investigados em oviduto-próstata de mo- luscos	07
II. MATERIAIS E MÉTODOS	10
1. Metodologia Experimental	10
1.1. Métodos Analíticos Gerais	10
1.2. Métodos Cromatográficos e Eletroforéticos	11
1.1.2. Cromatografia em papel (c.p.) e em camada del- gada (c.c.d.)	11
1.2.2. Cromatografia em fase gasosa (c.f.g.)	11

1.2.3. Cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massa (c.f.g.-e.m.)	13
1.2.4. Eletroforese em papel	13
1.3. Ressonância Magnética Nuclear de Carbono - (r.m.n.- ^{13}C)	13
1.3.1. Estabelecimento da composição química quantitativa de heteropolissacarídeos por r.m.n.- ^{13}C	15
1.4. Ressonância Magnética Nuclear de Prótons (r.m.n.- ^1H)	15
1.5. Métodos Espectrofotométricos	
2. Isolamento dos Polissacarídeos da Região do Oviduto-próstata de <i>M. paranaguensis</i>	18
2.1. Coleta	18
2.2. Dissecção	19
2.3. Delipidificação	19
2.4. Desproteínização	20
2.5. Fracionamento por precipitação com base quaternária	21
3. Análise dos Polissacarídeos Isolados do Oviduto-próstata de <i>M. paranaguensis</i>	22
3.1. Homogeneidade da Fração Polissacarídica OP-pH7	
3.1.1. Filtração em gel	22
3.1.2. Troca iônica	23
3.1.2.1. Gradiente contínuo	23
3.1.2.2. Eluição por etapas	23
3.2. Determinação do Equivalente de Neutralização do Polissacarídeo OP-I	24

3.3. Hidrólise Ácida dos Polissacarídeos de <i>M. paranaguensis</i>	25
3.3.1. Açúcares neutros	25
3.3.2. Açúcares aminados	26
3.3.3. Açúcares ácidos	26
3.4. Redução e Acetilação dos Produtos de Hidrólise Ácida dos Polissacarídeos de <i>M. paranaguensis</i>	27
3.5. Metilação da Fração Polissacarídica OP-I	28
3.6. Redução com LiAlH_4 do Polissacarídeo OP-I Metilado	29
3.7. Análises dos Produtos de Hidrólise Ácida do Polissacarídeo OP-I Metilado	30
3.8. Oxidação com NaIO_4 do Polissacarídeo OP-I	31
3.8.1. Determinação do consumo de NaIO_4	31
3.8.2. Produção de ácido fórmico e formaldeído	32
3.9. Degradação Tipo Smith do Polissacarídeo OP-I	33
3.10. Reações de Aglutinação Específicas entre Lectinas e a Fração OP-I	34
3.11. Carboxi-redução da Fração OP-I	34

III. RESULTADOS E DISCUSSÃO 35

1. Isolamento da Fração Polissacarídica do Oviduto-próstata de <i>M. paranaguensis</i>	35
2. Purificação da Fração Polissacarídica do Oviduto-próstata de <i>M. paranaguensis</i>	37
3. Precipitação Fracionada com Base Quaternária da Fração Polissacarídica do Oviduto-próstata de <i>M. paranaguensis</i>	41

4. Homogeneidade da Fração Polissacarídica de Ovi- duto-próstata de <i>M. paranaguensis</i>	44
5. Composição Química Qualitativa da Fração OP-I .	52
6. Composição Química Quantitativa da Fração OP-I .	74
7. Análise de Metilação da Fração Polissacarídica OP-I	86
8. Oxidação com Meta-periodato de Sódio da Fração OP-I	95
9. Degradação de Smith (Hidrólise Total) da Fração OP-I	98
10. Fatores que Influenciam a Hidrólise Ácida de Li- gações Glicosídicas	102
11. Metodologia Utilizada na Análise de Polissacarí- deos com Algumas Semelhanças Estruturais à Fra- ção OP-I	119
12. Reações de Aglutinação Específicas entre Lecti- nas e a Fração OP-pH 7	126
IV. APÊNDICE	130
V. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	132

AGRADECIMENTOS

Aos Professores, Dr. José Hazencleve Duarte e Dr. Philip Albert James Gorin, pelo incentivo e dedicada orientação.

Aos Professores, Dr. José Domingos Fontana, Dra. Glaci T. Zancan, Dr. Marcello Iacomini, Dr. Marco Aurélio L. Feijó e Gissélia R. Duarte, pelas valiosas sugestões dadas durante o desenvolvimento deste trabalho.

À Professora Dra. Muriel M. Vieira, pela determinação do ácido pirúvico através da desidrogenase láctica.

À Professora Maria Eugênia R. Duarte, pelas contribuições relativas à investigação do ácido urônico.

Aos Professores, Dr. João Batista Chaves Corrêa e Dra. Fany Reicher, pela colaboração nas análises por cromatografia em fase gasosa.

Ao Dr. G. Uhlenbruck (Colônia, Alemanha), pela investigação por lectinas das propriedades imunoquímicas do polissacarídeo.

Ao Dr. M. Mazurek e Dr. L. Hogge, do Plant Biotechnology Institute, National Research Council, Saskatoon, Canadá, pelas análises de r.m.n.-¹³C e c.f.g.-e.m., respectivamente.

Aos colegas e amigos, cujo exemplo, amizade e incentivo permanentes propiciaram a realização deste trabalho.

À Nilce do Rocio Chiquito, pela qualidade do serviço de datilografia.

A todos os professores e funcionários do Departamento de Bioquímica.

A equipe da Biblioteca do Setor de Ciências Biológicas.

Ao CNPq, pelo suporte financeiro.

LISTA DE FIGURAS

FIGURAS

01	Análise por c.p. ascendente dos hidrolisados das frações polissacarídicas, isoladas do oviduto -próstata de <i>M. paranaguensis</i> por precipitação com Cetavlon	40
02	Análise dos produtos de hidrólise ácida da fração OP-pH 7 por c.f.g., na forma de acetatos alditóis	43
03	Investigação da homogeneidade da fração OP-pH 7 por filtração em gel	45
04	Cromatografia de troca iônica da fração OP-pH 7 em DEAE-celulose, com eluição por gradiente contínuo	48
05	Cromatografia de troca iônica da fração OP-ph 7 em DEAE-celulose, eluição por etapas	50
06	Análise por c.p. ascendente dos produtos de hidrólise ácida da fração OP-I	53
07	Análise do hidrolisado da fração OP-I por c.f.g. , na forma de acetatos de alditóis	55
08	Análise por c.f.g.-e.m. dos produtos de hidrólise ácida da fração OP-I, na forma de acetatos alditóis	56

09	Espectro de r.m.n.- ^{13}C da fração OP-pH7 obtido a 100 MHz em relação ao núcleo de ^1H , na temperatura de 70°, em D_2O	59
10	Espectro de r.m.n.- ^1H da fração OP-pH 7, obtido a 100 MHz em relação ao núcleo de ^1H , com a técnica de pré-saturação, na temperatura de 70°, em D_2O	60
11	Análise por c.p. ascendente dos produtos de oxidação com ninidrina da fração OP-I	62
12	Análise por c.p. descendente dos produtos de hidrólise ácida da fração OP-I	63
13	Análise dos produtos de hidrólise ácida da fração OP-I por c.f.g., na forma de acetatos de alditóis	65
14	Análise por c.f.g. de <i>N</i> -acetil-hexosaminitóis per- <i>O</i> -acetilados	66
15	Análise por c.p. ascendente (fase móvel b , visualizador 4) dos produtos de hidrólise ácida da fração OP-I	68
16	Eletroforese de alta voltagem dos produtos de hidrólise ácida da fração OP-I	70
17	Espectro de r.m.n.- ^{13}C da fração OP-I, obtido a 360 MHz em relação ao núcleo de ^1H , na temperatura de 33°, em D_2O	71
18	Análise por c.f.g.-e.m. dos produtos de hidrólise da fração OP-I metilada e reduzida, na forma de acetato de alditóis parcialmente metilados	88
19	Curva de oxidação com meta-periodato de sódio da fração OP-I	97

20	Análise por c.f.g. dos produtos de degradação de Smith da fração OP-I	100
21	Análise por c.f.g. dos produtos de hidrólise áci da fração OP-I carboxi-reduzida (derivado de car diimida)	122
22	Localização anatômica do oviduto-próstata	131

LISTA DE TABELAS

TABELAS

I	Composição química das frações polissacarídicas purificadas por cromatografia de troca iônica .	51
II	Deslocamentos químicos observados na análise por r.m.n.- ¹³ C das frações OP-I e OP-pH 7	72
III	Composição química da fração polissacarídica OP-I	75
IV	Composição química das frações OP-I e OP-pH 7 , determinadas pelos métodos químico e espectroscópico (r.m.n.- ¹³ C)	83
V	Análise por c.f.g.-e.m. dos produtos de hidrólise ácida da fração OP-I metilada e reduzida	93

LISTA DE ESQUEMAS

A	-	Classificação estrutural dos polissacarídeos de moluscos	6
B	-	Isolamento da fração polissacarídica do oviduto -próstata de <i>M. paranaguensis</i>	36
C	-	Purificação da fração polissacarídica de oviduto-próstata de <i>M. paranaguensis</i>	38
D	-	Representação dos loci específicos para algumas lectinas em substâncias específicas dos grupos sanguíneos (estrutura hipotética)	129

LISTA DE SIGLAS

c.c.d.	- cromatografia em camada delgada.
c.f.g.	- cromatografia em fase gasosa.
c.f.g.-e.m.	- cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria.
c.p.	- cromatografia em papel.
D ₂ O	- óxido de deutério.
d.i.	- diâmetro interno.
Fração OP	- fração polissacarídica bruta, isolada do ovidu <u>to</u> -próstata de <i>M. paranaguensis</i> .
Fração OP-pH 7	- fração polissacarídica ácida, obtida pela puri <u>fi</u> cação da fração OP por precipitação fraciona <u>da</u> com Cetavlon em pH 7.
Fração OP-pH 8,5	- fração polissacarídica neutra, obtida pela puri <u>fi</u> cação da fração OP por precipitação fracio <u>na</u> da com Cetavlon em pH 8,5.
Fração OP-I	- fração polissacarídica ácida, obtida pela puri <u>fi</u> cação da fração OP-pH 7 por cromatografia de troca iônica (DEAE-celulose, forma Cl ⁻), sob e <u>lu</u> ição com cloreto de potássio 0,25M fração ma <u>jo</u> ritária).
G	- força centrífuga
i.e.	- impacto de elétrons.
M	- Molaridade
m/e	- relação massa/carga

M_{Gal}	- mobilidade eletroforética em relação à galactose.
NADH	- nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzido.
R_{Gal}	- migração cromatográfica em papel, relativa à galactose.
r.m.n.	- ressonância magnética nuclear.
T	- tempo de retenção relativo ao arabinitol penta- <i>O</i> -acetilado.

RESUMO

Uma fração polissacarídica ácida, isolada do oviduto-próstata do molusco *Megalobulimus paranaguensis*, foi purificada por precipitação fracionada com Cetavlon (em pH 7) e mostrou-se homogênea em Bio-gel P-5 (milhões). Esta fração, submetida à cromatografia de troca iônica em coluna de DEAE-celulose (forma Cl^-), forneceu uma sub-fração majoritária (fração OP-I), eluída da coluna com cloreto de potássio 0,25M. A fração OP-I, formada por uma relação aproximadamente equimolar entre unidades de fucose, galactose, *N*-acetil-glucosamina e ácido urônico, apresentou um equivalente de neutralização de 590.

Análise de metilação indicou uma estrutura ramificada, contendo unidades de galactopirranose substituídas em O-2 e como grupos terminais não redutores, além de unidades de fucopirranose e 2-acetamido-2-deoxi-glucopirranose substituídas em O-4. Análise por r.m.n.- ^{13}C foi consistente com as configurações β , α e α para estas unidades, respectivamente. Os dados de oxidação com periodato concordam com aqueles da análise de metilação e também indicam que as unidades de ácido urônico são resistentes à oxidação.

Aglutinação com lectinas de *Tridacna gigas* e *Geodia cynodium*, específicas para grupos terminais não redutores de

(β ?) - D-galactopiranoose, demonstraram que as unidades de galactosil apresentam a configuração absoluta D.

Trata-se de um heteropolissacarídeo ácido ainda não descrito em literatura.

SUMMARY

A polysaccharide was isolated from the oviduct-prostate of the snail *Megalobulimus paranaguensis* and purified by precipitation with Cetavlon and found to be homogeneous on chromatography on Bio-gel P-5 (millions). It was acidic with a neutral equivalent of 590 and contained approximately equimolar proportions of fucose, galactose, *N*-acetylglucosamine, and a uronic acid.

Methylation analysis indicated a branched structure with nonreducing end-groups of galactopyranose and 4-*O*-substituted residues of fucopyranose and 2-acetamido-2-deoxy-glucopyranose.

^{13}C -n.m.r. analysis was consistent with β , α and α -glycosidic configurations respectively. Periodate oxidation data was consistent with those of the methylation analysis and also indicated that uronic acid residues were resistant to oxidation. Agglutination with the lectins *Tridacna gigas* e *Geodia cynodidum*, specific for nonreducing end-groups of (β ?) -D -galactopyranose, shows that the galactosyl units have the D -configuration. Other polysaccharides, even with remote structural similarities, have not been previously reported.

I - INTRODUÇÃO

Várias investigações sobre estrutura de polissacarídeos de moluscos foram realizadas nos polímeros isolados, geralmente, de glândula de albúmen, massas de ovas e hepatopâncreas (glândula digestiva).

Os polissacarídeos isolados de glândula de albúmen e massa de ovas de moluscos são polímeros ramificados, formados por unidades de galactose (galactanas) ou heteropolissacarídeos que apresentam um núcleo formado por unidades de galactose.

As unidades constituintes destes polímeros são do tipo piranosídico, apresentando conformação 4C_1 . Entretanto, a conformação 1C_4 foi observada em certos polímeros, contendo $\underline{\underline{L}}$ -galactopirranose^{14, 21, 76} e $\underline{\underline{L}}$ -fucopirranose⁴⁸. Não foram detectadas, até então, unidades de hexofuranose nos polímeros já investigados.

A configuração beta ocorre caracteristicamente em $\underline{\underline{D}}$ -galactopirrananas, enquanto que a configuração alfa tem sido observada em polímeros que contêm o $\underline{\underline{L}}$ -enantiômero correspondente^{14, 21, 76} e em heteropolímeros formados por unidades de $\underline{\underline{L}}$ -fucopirranose⁴⁸ ou de unidades de $\underline{\underline{D}}$ -glucopirranose⁴⁹.

VARIAÇÕES ESTRUTURAIS NA PERIFERIA DE POLISSACARÍDEOS CONTENDO GALACTOSE

Foi observado que as galactanas isoladas de diferentes gêneros de moluscos Gastropoda não formam um grupo quimicamente homogêneo, como ocorre com o glicogênio, tendo sido observadas variações estruturais principalmente na periferia de tais macromoléculas. Estas variações estruturais ocorrem em galactanas isoladas da espécie de moluscos do gênero *Ampullarius* (= *Pomacea*), bem como em espécies de moluscos de outros gêneros.

Da massa de ovas de *Ampullarius* sp. (Pelotas, RS)⁴⁹ foi isolada uma glucogalactana, $[\alpha]_D^{25} + 40,80$ (c 1,0, água), contendo um núcleo formado por unidades de β -D-galactopiranosose (71%) e por unidades de α -D-glucopiranosose, distribuídas na periferia da molécula (29%). A rotação ótica observada para este polímero indicava a presença de unidades em configuração α -D-. Entretanto, a configuração alfa foi atribuída às unidades de D-glucopiranosose, somente pela análise por espectroscopia de r.m.n.-¹³C do dissacarídeo 4-O- α -D-glucopiranosil-D-galactose, obtido pela hidrólise ácida parcial do heteropolissacarídeo.

Uma fucogalactana, $[\alpha]_D^{25} + 510$ (c 0,76, H₂O), foi também observada por FEIJÓ & DUARTE⁴⁸ em *Ampullarius* sp. (Morretes, PR), sendo que as unidades de L-fucopiranosose (2%) também se localizavam na periferia da macromolécula. Este polímero³⁴ diferencia-se da fucogalactana isolada de *Marisa cornuarietis* por conter substituição em O-2. Tal substituição foi demonstrada pela identificação de um derivado, 2,3,5-tri-O-metil-

D-lixose, obtido após oxidação com periodato dos produtos de hidrólise ácida do polímero metilado. Embora este tipo de substituição tenha sido descrito pela primeira vez em polímero isolado de *Ampullarius* sp., recentemente, BRETTING *et al.*²¹ as sinalaram sua presença em polissacarídeos de moluscos da família Helicidae.

Um polímero, $[\alpha]_D^{25} + 36,69$ (c 0,5, NaOH 0,1M), formado de unidades de β -D-galactopiranoose, grupo acetil e acetal de ácido pirúvico, numa relação molar de 20:5:1, foi investigado por DUARTE³⁴ na glândula albúmen de *Pomacea lineata* (Recife, PE). O posicionamento do acetal de ácido pirúvico foi estabelecido por metilação como sendo 3,4-*O*-(1-carboxietilideno)-D-galactopiranoose, enquanto que sua configuração absoluta, tipo endocarboxílica, foi assinalada por espectroscopia de ¹H- e ¹³C-r.m.n. .

Embora a presença de acetal de ácido pirúvico tenha sido demonstrada previamente em ágar^{41,42} e em polissacarídeos isolados de microorganismos^{47,59,62,64} este acetal não havia ainda sido descrito em polissacarídeos de moluscos. Posteriormente, foi comprovado que tal substituinte era comum aos polímeros isolados de moluscos da família Ampullariidae³⁵.

Polímeros contendo unidades de D- e L-galactopiranoose foram encontrados em espécies de moluscos da família Helicidae. As galactanas de glândula de albúmen e massa de ovas de *Helix pomatia* contêm β -D- e α -L-galactopiranoose, numa proporção aproximada de 6:1, identificadas na forma do derivado benzimidazólico (2-D,L-galactobenzimidazol) como descrito por BELL & BALDWIN¹⁴. As unidades de L-galactopiranoose estão totalmente distribuídas na periferia da molécula, como unidades terminais não redutoras.

LEONTEIN *et al.*⁷⁶, utilizando o reagente quiral (+)-2-octanol, confirmaram os dados previamente obtidos sobre a presença de D- e L-galactopiranosose na galactana de glândula de albúmen de *H.pomatia*. Para tanto, os produtos de hidrólise da galactana foram analisados por c.f.g (coluna capilar com fase estacionária SP-1000) na forma dos derivados (+)-2-octil galactosídeos acetilados, os quais apresentaram picos correspondentes aos isômeros D e L. A configuração alfa foi atribuída às unidades L-galactopiranosose, pela presença do dissacarídeo 6- O - α -L-galactopiranosil-D-galactose entre os produtos de hidrólise ácida parcial^{83a}.

Um estudo mais amplo sobre a distribuição de L-galactopiranosose em polissacarídeos de moluscos da família Helicidae foi efetuado por BRETTING *et al.*²¹. Assim, a quantificação por c.f.g., utilizando coluna capilar com fase estacionária quiral XE-60-L-valina-(S)- α -feniletilamida, demonstrou a presença deste enantiômero em *H.pomatia* (14%), *Arianta arbustorum* (14,1%) e *Cepaea nemoralis* (11,5%).

Estes autores também evidenciaram a presença de L-galactose em galactana de *Marisa* sp. (15,2%), família Ampullariidae e sua ausência em galactanas de *Achatina fulica* (Achatinidae), *Arion* sp. (Arionidae)²¹ e em *Lymnaea stagnalis* (Lymnaeidae)²².

Entretanto, nas investigações sobre a configuração absoluta das unidades constituintes da fucogalactana de *Marisa cornuarietis*³⁴, proveniente da região do pantanal mato-grossense (MS), não foi observada a ocorrência de L-galactose.

Este polissacarídeo contém, em adição às unidades de β -D-galactopiranosose, unidades de L-fucopiranosose, grupos acetil

e acetal de ácido pirúvico, numa relação molar 20:5:1.

Dados de metilação indicaram uma estrutura altamente ramificada, representada por um núcleo de β -D-galactopirranana e grupos terminais não redutores constituídos, em parte, por unidades de α -L-fucopirranose. A preponderância de ligações (1 \rightarrow 3) sobre (1 \rightarrow 6), observada neste polímero, é comum à maioria das galactanas já investigadas em moluscos^{70,100}.

Na galactana de glândula de albúmen de *Megalobulimus paranaguensis*⁵³ foi comprovado, por espectroscopia de r.m.n.-¹³C, que aproximadamente 30% do fósforo total encontrava-se na forma de 2-aminoetilfosfonato e que tal grupo estava esterificado em O-6 de certas unidades do polímero. O éster de ácido aminoetilfosfônico foi também observado em galactana de glândula de albúmen de *Biomphalaria glabrata* e em polímeros isolados de algumas espécies de *Ampullarius*³⁵.

PRINCIPAIS TIPOS DE NÚCLEOS OBSERVADOS EM POLISSACARÍDEOS CONTENDO GALACTOSE

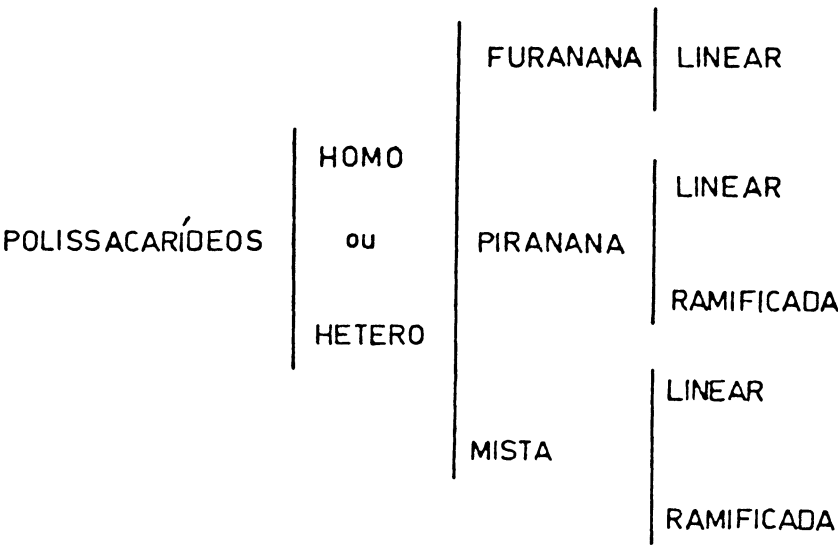
Os polissacarídeos isolados de moluscos são altamente ramificados e de peso molecular elevado, apresentando uma cadeia principal à qual se ligam cadeias laterais de tamanhos variáveis. Polímeros lineares não foram detectados nas espécies de moluscos estudadas.

Na classificação estabelecida por DUARTE³⁵, representada no Esquema A, os polissacarídeos de moluscos pertencem às classes de homo e heteropirrananas ramificadas.

A estrutura fina da galactana isolada de glândula de al

ESQUEMA A

CLASSIFICAÇÃO ESTRUTURAL DOS
POLISSACARÍDEOS DE MOLUSCOS.



būmen do molusco *Strophocheilus* (= *Megalobulimus*) *oblongus* foi estabelecida por SEGURA & DUARTE¹⁰⁰. Os dados de metilação e de degradação sequenciada de Smith indicaram que a cadeia principal é constituída de unidades substituídas em 0-3, apresentando pontos ramificados em 0-6 por cadeias laterais de tamanhos variáveis. Tal estrutura foi também observada em galactanas de três espécies de moluscos do gênero *Biomphalaria* (*B.tenagophila*, *B.straminea* e *B.glabrata*)⁷⁰.

Por outro lado, BRETTING *et al.*²² demonstraram que a galactana de *Lymnaea stagnalis* não é formada por uma estrutura dicotômica e não contém cadeia principal substituída em 0-3, como assinalado para a galactana de *S.oblongus*. O modelo sugerido foi o de um polímero ramificado, onde substituições em 0-3 e 0-6 encontram-se alternadas. Entretanto, um modelo alternativo, cuja cadeia principal seja formada por substituição em 0-6, com pontos de ramificação em 0-3, não foi eliminado.

POLISSACARÍDEOS INVESTIGADOS EM OVIDUTO-PRÓSTATA DE MOLUSCOS.

Em contraste com as investigações realizadas sobre polissacarídeos da glândula de albúmen e massa de ovas, pouca atenção tem sido dada aos polissacarídeos presentes na região do oviduto-próstata de moluscos (Apêndice).

Uma fração polissacarídica não bem diferenciada, isolada por DUARTE & MORETTO³⁷ de oviduto-próstata de molusco *Strophocheilus oblongus*, foi submetida a uma precipitação fracionada com Cetavlon (brometo de hexadeciltrimetilamônio) e forneceu duas frações em diferentes pH. A análise cromatográfica dos produtos de hidrólise demonstrou que a fração ácida era composta por unidades de fucose, galactose, glucose, ácido urônico e um componente não identificado, enquanto que a fração neutra era constituída de unidades de glucose e galactose. A ocorrência de um heteropolissacarídeo ácido em oviduto do molusco *Australorbis (Biomphalaria) glabratus* foi demonstrada anteriormente, através de técnicas histoquímicas, por CHIA-TUNG-PAN²⁷, mas a presença de um polímero neutro (glucogalactana) neste órgão não havia ainda sido reconhecida.

Os dados de metilação obtidos por DUARTE & IACOMINI²⁸ para a fucogalactana de oviduto-próstata de *Vaginulus* sp. demonstraram a presença de unidades de β -D-galactopiranosil 4-O- (29%), 6-O- (6%) e 3,4-di-O-substituídas (38%), com grupos terminais não redutores formados por unidades de β -D-galactopiranosose (22%) e α -L-fucopiranosose (5%). Os produtos de degradação de Smith deste polímero (glicerol, 43%; treitol, 29%; dulcitol,

28%) estão em concordância com os dados de metilação. A presença de treitol entre os produtos desta degradação confirma a existência de substituição em 0-4 no polímero.

A fucogalactana de *Vaginulus* sp. foi submetida ao tratamento com o reagente de Fehling, fornecendo duas frações, F-1 e F-2, cujas proporções molares de fucopirranose foram de 16 e 20 moles%, respectivamente. Acetal de ácido pirúvico foi constatado em ambas as frações (5 moles%), enquanto que a presença de grupos acetil foi verificada apenas na fração F-1 (10 moles%). Nenhuma dissociação foi observada na fração ácida de *M. paranaguensis*, ao ser submetida a um tratamento semelhante.

IACOMINI *et al.*⁷¹ isolaram as frações polissacarídicas da região do oviduto-próstata dos moluscos *M. paranaguensis* e *Vaginulus* sp., ambas por precipitação fracionada com Cetavlon em pH 7. A análise da composição em açúcares neutros (c.f.g.) realizada nestas frações demonstrou, respectivamente, uma relação molar de 0,53:1 e de 0,25:1 em unidades de fucopirranose e galactopirranose.

DUARTE *et al.*³⁸, reinvestigando os açúcares neutros da fração polissacarídica de oviduto-próstata de *M. paranaguensis*, obtiveram uma relação molar (c.f.g.) de 1:1 em unidades de fucopirranose e galactopirranose. Uma análise química mais detalhada⁹⁶ demonstrou que esta fração era constituída por fucopirranose, galactopirranose, hexosamina e grupos sulfato, numa relação molar aproximada de 1,1:1:0,4:0,4. A homogeneidade desta fração foi testada por cromatografia de troca iônica (coluna de DEAE-celulose), fornecendo uma fração majoritária quimicamente homogênea. Estudos posteriores⁹⁵ demonstraram que esta fração

era constituída por fucopirranose, galactopirranose, *N*-acetil-hexosamina e ácido urônico, numa relação molar de 1,9:1:1,1:1. Grupos *O*-acetil e acetal de ácido pirúvico não foram detectados no polímero.

A região do oviduto-próstata de moluscos apresenta diferentes tipos de polissacarídeos, de estruturas ainda não bem caracterizadas.

O presente trabalho descreve um estudo mais detalhado sobre a fração polissacarídica isolada de oviduto-próstata de *M. paranaguensis*, o qual apresenta uma composição química muito mais complexa do que a previamente determinada por outros autores. Trata-se de um heteropolissacarídeo ácido ainda não descrito em literatura.

II. MATERIAIS E MÉTODOS

1. METODOLOGIA EXPERIMENTAL

1.1. Métodos Analíticos Gerais

As evaporações foram realizadas em evaporador rotatório Büchi, geralmente em temperaturas inferiores a 50°.

As determinações espectrofotométricas, na região do ultravioleta próximo, foram realizadas em espectrofotômetro Varian 635 D, a $30 \pm 0,1^\circ$, enquanto as determinações colorimétricas, na região visível, foram procedidas em espectrofotômetro Coleman Júnior, modelo 6A.

As soluções dos polissacarídeos fracionados foram centrifugadas a 12.000 rpm (20.000 G) em centrífuga analítica Sorvall, modelo RC 5, mantida sob refrigeração em temperatura média de 10°. As centrifugações rotineiras foram realizadas em centrífugas clínicas convencionais.

A liofilização de soluções aquosas contendo amostras carboidratadas foi feita em aparelho Virtis, modelo 10-145 MB-BA.

As medidas e aferições da concentração hidrogeniônica das soluções, envolvidas nas diversas metodologias aplicadas, foram procedidas em potenciômetro Ambriex, modelo pH 0-14.

1.2. Métodos Cromatográficos e Eletroforéticos.

1.2.1. Cromatografia em papel (c.p.) e em camada delgada (c.c.d.)

As análises cromatográficas em papel foram desenvolvidas pelas técnicas ascendente e descendente empregando papel Whatman nº 1 como fase estacionária, enquanto que em cromatografia em camada delgada, placas de celulose (Merck) foram utilizadas para este fim.

Os sistemas de solventes utilizados para as corridas cromatográficas foram: (a) benzeno-*n*-butanol-piridina-água (1:5:3:3, v/v, fase superior)⁵⁶; (b) piridina-acetato de etila-ácido acético-água (5:5:1:3, v/v, fase superior)⁶⁶; (c) acetato de etila-ácido acético-água (3:1:1, v/v)¹⁰⁸; (d) acetona-*n*-propanol-etanol-tampão borato 0,1M pH 10 (3:1:1:2, v/v)⁸⁶.

Os reagentes visualizadores utilizados foram: (1) nitrato de prata alcalino¹¹³, para açúcares de um modo geral; (2) cloridrato de *p*-anisidina seguido por aquecimento a 105º⁶⁹, para açúcares redutores; (3) ninidrina a 0,2% em acetona seguida por aquecimento a 105º²⁹, para amino-açúcares; (4) solução alcoólica de azul de bromofenol a 0,05g% (p/v), pH 6,5,³⁰ para ácidos urônicos.

A migração cromatográfica dos produtos das diferentes hidrólises ácidas dos polissacarídeos foi relacionada à migração da D-galactose, usada como padrão de referência.

1.2.2. Cromatografia em fase gasosa (c.f.g.)

Em função da disponibilidade das colunas empregadas para a análise cromatográfica dos diferentes produtos de derivatização, obtidos por metodologias específicas, foram utilizados dois

aparelhos, cujas características estão abaixo relacionadas:

a) Cromatôgrafo Varian, modelo 2440, com detector de ionização de chama e usando nitrogênio como gás de arraste (40 ml/min). A temperatura da câmara de injeção e do detector foram, respectivamente, 200 e 250°. A coluna de aço inoxidável (200 x 0,15cm de d.i.), empacotada com ECNSS-M a 3% (p/p) sobre Gas Chrom Q (100 - 200 mesh), foi empregada na quantificação dos acetatos de alditóis (à temperatura de 180° ou com programação de temperatura de 120 a 180°, com variação de 4° por minuto) e dos acetatos de alditóis parcialmente metilados (à temperatura de 170°).

b) Cromatôgrafo CG, modelo 37, com detector de ionização de chama e usando nitrogênio como gás de arraste (60 ml/min). As temperaturas do vaporizador e do ionizador foram controladas para superarem, respectivamente, em 20 e 40° a temperatura estabelecida na coluna. A coluna de aço inoxidável (180 X 0,48cm de d.i.) utilizada neste aparelho, empacotada com OV-225 a 3% (p/p) sobre CHR Q (AW - DMCS), foi empregada na quantificação dos acetatos de alditóis (às temperaturas de 190 e 227°) e dos acetatos de alditóis parcialmente metilados (à temperatura de 170°).

A composição molar foi calculada em função da área registrada para cada componente, pelo método da triangulação⁹⁸. Os tempos de retenção dos acetatos de alditóis foram relacionados ao do arabinitol penta-O-acetato, enquanto que os dos acetatos de alditóis parcialmente metilados, ao do 1,5-di-O-acetil-2,3,4,6-tetra-O-metil-D-glucitol.

1.2.3. Cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massa (c.f.g.-e.m.).

As análises por c.f.g.-e.m. foram realizadas em Espectrômetro marca Finnigan, modelo 4000, dotado de sistema de dados Inco 2300 e equipado com coluna capilar de sílica fundida (30m X 0,25mm de d.i.), revestida com DB-210. Os espectros dos acetatos de alditóis foram obtidos por impacto de elétrons, repetitivamente a cada 2 segundos, desde massa 40 até 420. As injeções foram feitas diretamente na coluna a 50°C usando o "split mode" e, então, a temperatura foi rapidamente programada (40°C por minuto) até 235°C e mantida constante. Foi utilizado hélio como gás de arraste, com velocidade linear de 22 cm/s. Os acetatos de alditóis foram identificados pela co-injeção de padrões e as áreas dos picos obtidas por integração automática.

Os espectros de massa (i.e.) obtidos foram interpretados de acordo com LÖNNGREN & SVENSSON⁷⁹ e os perfis de fragmentação, característicos a cada tipo de estrutura, foram comparados com aqueles obtidos de padrões sintéticos^{73,107}.

1.2.4. Eletroforese em papel.

A eletroforese em papel dos produtos de hidrólise ácida do polissacarídeo foi realizada em cuba de imersão, contendo tetracloreto de carbono como refrigerante, com uma diferença de potencial aplicada da ordem de 1700 Volts, correspondente a passagem de uma corrente de 10-15 mA sobre um papel (Whatman nº 1) com 57 X 25 cm. Para a exploração do caráter ácido dos componentes do hidrolisado, foi utilizado como tampão eletroforético uma solução de cloreto de cálcio 5mM em tampão borato 10mM⁶⁶.

1.3. Ressonância Magnética Nuclear de Carbono - ^{13}C (r.m.n.- ^{13}C).

Os espectros de ressonância magnética nuclear de ^{13}C foram realizados em espectrômetros incorporados ao transformador de Fourier. Os seguintes aparelhos foram utilizados:

A. Espectrômetro Bruker AM-360W. Uma solução (100 mg em 2 ml de D_2O) do polissacarídeo foi colocada num tubo de 200 X 10 mm de d.i. e examinada à temperatura de 33°. Os parâmetros espectrais empregados foram: "sweep width" de 20.000 Hz, "pulse width" de 21,0 μ segundos, "acquisition time" de 0,41 segundos, "number of transients" de 10544 e "line broadening" de 6 Hz. Os espectros foram obtidos em 360 MHz em relação ao núcleo de ^1H (90,53 MHz em relação ao núcleo de ^{13}C).

B. Espectrômetro Varian XL-100-15. Uma solução (100 mg em 2 ml D_2O) de polissacarídeo, contida em um cilindro coaxial, foi colocada em um tubo de 200 x 12 mm de d.i. e examinada à temperatura de 70°. Os parâmetros espectrais foram: "sweep width" de 5000 Hz, "pulse width" de 20,1 μ segundos, "acquisition time" de 0,41 segundos e "number of transients" de 168600. Os espectros foram obtidos em 100 MHz com respeito ao ^1H (25,16 MHz em relação ao núcleo de ^{13}C).

Os deslocamentos químicos foram expressos em δ (ppm), relativamente à ressonância do tetrametilsilano (TMS), determinado em experimento distinto.

Os deslocamentos químicos, obtidos à temperatura de 33°, podem ser comparados com aqueles obtidos a 70° pelo acréscimo de 1 ppm⁶¹.

1.3.1. Estabelecimento da composição química quantitativa de heteropolissacarídeos por r.m.n.- ^{13}C .

Para quantificar os componentes das frações polissacarídicas investigadas por espectroscopia de ressonância de ^{13}C , os espectros originais foram ampliados aproximadamente quatro vezes. Os picos dos sinais com sentido quantitativo, identificados no espectro, foram cuidadosamente recortados e pesados em balança analítica. O peso de cada área representa a média de três de terminações.

A quantificação foi então determinada através da contribuição percentual das áreas (peso em mg) dos picos do carbono C-1 de cada unidade do polímero, sobre a somatória das áreas (peso em mg) de todos os picos de C-1 presentes no espectro.

1.4. Ressonância Magnética Nuclear de Prótons (r.m.n.- ^1H).

O espectro de ressonância magnética nuclear de prótons (^1H) foi realizado em espectrômetro Varian XL-100-15, em 100 MHz em relação ao núcleo de ^1H (709), com aplicação da técnica de pré-saturação. Os parâmetros espectrais utilizados foram: "sweep width" de 1000 Hz, "pulse width" de 38,27 μ segundos, "acquisition time" de 2,05 segundos e "number of transients" de 200.

1.5. Métodos Espectrofotométricos

A dosagem de açúcar total, pelo método do fenol-ácido sulfúrico³⁹, foi utilizada no acompanhamento dos processos cromatográficos em coluna. A determinação quantitativa de proteínas foi realizada com o reagente fenólico de Folin-Ciocalteu, segundo o método de LOWRY *et al.*⁸¹.

O peso seco das amostras foi determinado em estufa a 100°, até o peso constante e serviu como parâmetro quantitativo nas dosagens químicas. As cinzas foram determinadas em mufla a 800°, até o peso constante.

Os açúcares aminos foram dosados com o reagente de ELSON-MORGAN⁴⁶ no produto de hidrólise ácida com ácido clorídrico 6*M*, sob atmosfera de nitrogênio, por 8 horas a 100°, após purificação em coluna (7 x 1cm de d.i.) de resina catiônica (Dowex 50W X 8, 200-400 mesh, forma H⁺), segundo o processo descrito por BOAS²⁰. Dada a natureza da hidrólise aplicada ao polímero, um experimento foi realizado visando estabelecer o percentual de recuperação de um padrão de cloridrato de D-glucosamina, quando submetido ao método.

O conteúdo total em grupos acetil foi determinado colorimetricamente sob a forma de acetato de metila, pela reação do ácido hidroxâmico, após destilação sob pressão reduzida do produto de metanólise do polímero, segundo o método descrito por LUDOWIEG & DORFMAN⁸². A metanólise foi procedida com HCl-metanol 2*M*, por 4 horas a temperatura de 100°, em ampola de vidro cuidadosamente selada. *N*-acetil-glucosamina foi submetida ao método e serviu como padrão para as dosagens.

A identificação do açúcar aminado presente no polissacarídeo foi realizada através de degradação oxidativa com ninidrina, em meio contendo piridina a 4%, como descrito por STOFFYN & JEANLOZ¹⁰⁸. A reação foi realizada em tubo capilar a 100° e seu desenvolvimento acompanhado por c.p. ascendente (fase móvel c, visualizador 1).

A presença de grupos *O*-acetil no polissacarídeo foi investigada na forma de complexo aceto-hidroxâmico, de acordo

com os métodos descritos por HESTRIN⁶⁸ e por McCOMB & McCREADY⁸⁴.

O grupo sulfato foi determinado colorimetricamente com o reagente alcalino de timol, na forma de complexo insolúvel benzidina-sulfato, segundo o processo descrito por ANTONOPOULOS⁶.

A pesquisa de fósforo total foi realizada nas cinzas obtidas pelo tratamento de uma amostra do polissacarídeo com ácido sulfúrico e ácido nítrico concentrados, em banho de areia, segundo os métodos por CHEN *et al.*²⁶ e BARTLETT¹³.

Os ácidos urônicos foram determinados no polissacarídeo pelo método do carbazol, modificado por DISCHE³². Tubos de referência contendo diferentes concentrações de D-galactose, D-glucosamina e L-fucose foram investigados pelo método, afim de minimizar as interferências devidas aos produtos de hidrólise ácida do polímero.

O ácido fórmico, liberado no processo degradativo com metaperiodato de sódio, foi determinado por titulação com hidróxido de sódio 0,01M, em atmosfera de nitrogênio, usando fenolftaleína como indicador, de acordo com BAKER & SOMERS¹⁰. A liberação de formaldeído foi também estimada, na forma de produto de condensação com acetil-acetona, utilizando o reagente de NASH⁸⁸, como descrito por VASKOVSKY & ISAY¹¹⁴.

A presença de ácido pirúvico foi investigado por método enzimático, utilizando desidrogenase láctica de músculo de coelho (tipo VII, da Sigma), nos produtos de hidrólise do polissacarídeo com ácido oxálico 0,08M (3 ml), durante 4 horas a 100°. Após neutralização com carbonato de cálcio e filtração, a solução teve seu volume aferido e alíquotas foram tomadas para serem submetidas às dosagens. Devido a suspeita de que o

Ion cálcio pudesse intervir como inibidor da atividade enzimática, um tratamento com resina catiônica (Dowex 50W X 8, 200-400 mesh, forma H^+) foi incluído em experimento paralelo. Os sistemas de incubação utilizados foram os seguintes: (a) tampão fosfato 0,5M pH 7,0 (0,8 ml), solução de NADH a 1% (10 μ l), solução de enzima em diluição 1:20 (10 μ l) e alíquota da solução do hidrolizado (0,2 ml), segundo o método de BERGMEYER & BERNT¹⁶; (b) trietanolamina 1M (0,5 ml), solução de NADH a 1% (10 μ l), solução de enzima em diluição 1:20 (10 μ l) e alíquota da solução hidrolizado (0,5 ml), de acordo com DUCKWORTH e YAPHE⁴⁰. A galactana piruvatada de glândula de albúmen da *Pomacea lineata* (SPIX, 1827), cuja composição em ácido pirúvico é conhecida³⁴, foi utilizada como controle das dosagens.

2. ISOLAMENTO DOS POLISSACARÍDEOS DA REGIÃO DO OVIDUTO-PRÓSTATA DE *M. paranaguensis*.

2.1. Coleta

Os espécimes do molusco Gastropoda terrestre *M. paranaguensis*, foram coletados numa região denominada Ponta da Pita, município de Antonina, Paraná, Brasil.

De cada coleta, realizadas nos meses de março a outubro de 1984, foram selecionados para dissecação do oviduto-próstata apenas os espécimes adultos de grande porte.

Antes de serem sacrificados, os moluscos permaneceram confinados durante aproximadamente dez dias, sob alimentação baseada em vegetais verdes e frescos (alface, repolho, couve). O viveiro foi mantido permanentemente úmido e, tanto quanto possí-

vel , limpo e livre de animais predatórios (formigas e pequenos crustáceos).

Embora algumas oviposições tenham sido observadas após sessenta dias de confinamento, não foi constatado o desenvolvimento dos ovos até a eclosão. As condições climáticas e nutricionais, diferentes daquelas de seu *habitat* e a ausência de espaço físico suficiente para a livre movimentação das matrizes, devem ter contribuído significativamente para a inibição do ciclo reprodutivo dos moluscos.

2.2. Dissecção

Apenas os moluscos adultos (400 espécimes) foram selecionados para a dissecção dos órgãos de interesse (oviduto-próstata, glândula de albúmen e fígado), removidos após a liberação de suas partes moles totais, através da remoção mecânica da concha. Os órgãos recém dissecados foram lavados cuidadosamente com água destilada, para a eliminação de contaminações superficiais com suco digestivo e rapidamente conservados em recipiente contendo acetona. Os 400 órgãos, correspondentes à região do oviduto-próstata, foram reunidos, triturados em liquidificador com acetona (500 ml) (3X) e filtrados em funil de Büchner, sob pressão reduzida. O resíduo obtido foi lavado com acetona anidra e seco à temperatura ambiente, perfazendo 135 gramas. Os outros órgãos dissecados foram conservados para estudos posteriores.

2.3. Delipidificação.

O pó cetônico foi suspenso em mistura de *n*-butanol saturado com água (1000 ml) (3X) e permaneceu por uma hora a 100°, sob refluxo. O resíduo foi então filtrado em funil de Büchner, sob

pressão reduzida, lavado com acetona e seco à temperatura ambiente. O pó cetônico assim obtido foi tratado com uma mistura de clorofórmio-metanol, 2:1, v/v (3X), sob agitação magnética por 12 horas e o resíduo filtrado, lavado com acetona e seco à temperatura ambiente, rendendo 130 gramas. Os extratos lipídicos foram reunidos, evaporados sob pressão reduzida à secura e solubilizados em clorofórmio. O resíduo obtido por evaporação do solvente correspondeu a 6% do peso de pó cetônico inicial (7% em termos de peso seco).

2.4. Desproteínização.

O pó cetônico livre de gorduras foi suspenso em solução de ácido acético/acetato de amônia 0,2M pH 8,5 e a ela foram a acrescentados subtilisina (Sigma, tipo II) (70 mg) e tolueno, como preservativo. A mistura desproteinizante foi mantida à temperatura de 37°. Aferições periódicas do pH foram feitas pela adição de hidróxido de amônia, quando novas quantidades de subtilisina foram acrescentadas (30 mg) (3X). Ao final de sete dias, a suspensão foi centrifugada e o resíduo submetido novamente ao tratamento com enzima proteolítica. Reunidos, os sobrenadantes foram desproteinizados com uma mistura de clorofórmio e álcool iso-amílico, segundo o processo de SEVAG descrito por STAUB¹⁰⁶. A epifase aquosa foi acidificada a pH 4,0 com ácido acético diluído e dialisada contra água corrente, depois ãgua destilada. A porção não dialisável foi concentrada sob presção reduzida e tratada com etanol(4 vol.). O resíduo, obtido por centrifugação, foi lavado com acetona anidra (3X) e seco em pistola contendo pentóxido de fósforo, rendendo 3 gramas.

2.5. Fracionamento por precipitação com base quaternária

A fração polissacarídica, livre de proteínas, foi purificada pela precipitação fracionada com base quaternária (brometo de hexadeciltrimetilamonium, da Sigma), como descrito por DUARTE & JONES³⁶. Em pH 7,0, houve a formação de um precipitado que, após centrifugação, foi tratado com solução de cloreto de sódio 0,25M, para a eliminação de traços de ácidos nucleicos. Após centrifugação, o resíduo foi desprezado e o sobrenadante tratado com etanol (4 vol.). O sedimento, obtido por centrifugação, foi suspenso em ácido acético 2M, tratado com etanol (4 vol.) e centrifugado (4X). Após a eliminação da base quaternária por este procedimento, o sedimento foi solubilizado e dialisado contra água destilada (3X). A porção não dialisável foi centrifugada sob refrigeração a 20.000 G por 30 minutos e o polissacarídeo recuperado do sobrenadante pelo tratamento com etanol (4 vol.). O resíduo, obtido por centrifugação, foi tratado com acetona anidra e seco em pistola contendo pentóxido de fósforo, rendendo aproximadamente 1% em termos do pó cetônico inicial (0,8% em peso seco). O polissacarídeo (1,25 g), de coloração branca, mostrou-se facilmente solúvel em água. Esta fração foi denominada de OP-pH7 e suas propriedades despertaram o interesse que se verifica consubstanciado neste trabalho.

Ao sobrenadante da precipitação em pH 7,0 foi adicionado tampão borato a 3% pH 8,5, 1:1 (v/v). Um precipitado, sob a forma de complexo base quaternária-borato-polissacarídeo, foi obtido por centrifugação. Após descomplexação e eliminação da base quaternária, como descrito anteriormente, o polissacarídeo foi dialisado contra água destilada (3X). A fração não dialisá

vel foi centrifugada sob refrigeração a 20.000 G por 30 minutos e, após a recuperação do polímero por tratamento com etanol (4 vol.) e centrifugação, o sedimento foi tratado com acetona anidra e seco em pistola contendo pentóxido de fósforo. Esta fração foi denominada de OP-pH 8,5 (0,75g) e apresentou um rendimento de aproximadamente 0,5% em relação ao pó cetônico inicial (0,4% em peso seco).

3. ANÁLISE DOS POLISSACARÍDEOS ISOLADOS DO OVIDUTO-PRÓSTATA DE *M. paranaguensis*.

3.1. Homogeneidade da Fração Polissacarídica OP-pH 7.

A homogeneidade do polissacarídeo OP-pH 7 foi investigada através de seu comportamento cromatográfico em colunas de peneira molecular BIO-GEL (BIO-RAD) e, após constatação de seu caráter ácido por processos analíticos, em colunas de troca iônica DEAE-celulose (Whatman), sob eluições por gradiente e por etapas.

3.1.1. Filtração em gel.

Amostras (10 mg) da fração polissacarídica foram submetidas à cromatografia de filtração em gel, com diferentes limites de exclusão, utilizando as colunas: BIO-GEL P-30 mil, BIO-GEL P-100 mil, BIO-GEL A-1,5 milhões e BIO-GEL A-5 milhões de daltons. Acetato de amônio 0,1M foi utilizado como eluente (fluxo médio de 90 ml/h), para evitar interações secundárias durante o processo cromatográfico. O volume morto destas colunas cromatográficas, exceto a de BIO-GEL P-5 milhões, foi determinado pela aplicação de uma amostra de azul de dextrana, em experimento paralelo.

3.1.2. Troca iônica

3.1.2.1. Gradiente contínuo.

Devido a natureza ácida da fração polissacarídica, uma amostra (10 mg) foi submetida à cromatografia em coluna de DEAE-celulose (25 X 1,6 cm de d.i.), forma Cl^- , obedecendo ao seguinte esquema de eluição (fluxo médio de 90 ml/h): (a) lavagem inicial com água; (b) gradiente contínuo de cloreto de potássio de 0-2M; (c) cloreto de potássio 2M e, finalmente, (d) hidróxido de sódio 0,1M. As sub-frações, obtidas em função do aumento da força iônica do eluente, foram localizadas por análise para carboidrato total e o perfil de eluição observado serviu para orientação da etapa seguinte de fracionamento.

3.1.2.2. Eluição por etapas.

Em função do comportamento cromatográfico do polissacarídeo OP-pH 7 no experimento anterior, uma amostra (100 mg) foi submetida à cromatografia em coluna de DEAE-celulose (50 X 3 cm de d.i.), forma Cl^- , utilizando o seguinte esquema de eluição: (a) lavagem com água destilada; (b) eluição por etapas com concentrações crescentes de cloreto de potássio (0,25M; 0,50M; 0,75M; 1,00M e 2,00M) e, finalmente, (c) hidróxido de sódio 0,1M. Cada etapa de eluição foi procedida até análise para carboidrato total negativa. As sub-frações obtidas foram dialisadas, liofilizadas e analisadas, após hidrólise ácida, por c.p. ascendente (fase móvel a, visualizador 1). Determinações analíticas complementares para sulfato e hexosaminas foram realizadas nas principais sub-frações.

A sub-fração obtida pela eluição da coluna com cloreto

de potássio 0,25M, denominada de OP-I, foi predominante, tornando-se apta, dentro dos critérios estabelecidos para este fim, a ser submetida à investigação analítica de sua composição química, bem como à identificação das premissas que orientarão o estabelecimento de sua estrutura.

3.2. Determinação do Equivalente de Neutralização do Polissacarídeo OP-I.

A determinação do equivalente de neutralização foi realizada por dois procedimentos distintos:

A. Uma alíquota (10 ml) de uma solução polissacarídica (5 mg/ml) foi percolada através de uma coluna de resina catiônica (Dowex 50W X 8, 200-400 mesh, forma H^+), previamente recuperada pela maneira usual. A coluna (25 X 1,6 cm de d.i.), após lavagem com água deionizada até análise para carboidrato total negativa, foi eluída com ácido fórmico 2M para comprovar a não retenção do polissacarídeo à resina, nestas condições. O eluato aquoso foi liofilizado e o polissacarídeo (36 mg) dissolvido em água deionizada (20 ml). A solução foi então titulada contra hidróxido de sódio 0,01M padronizado, sob atmosfera de hidrogênio e usando fenolftaleína como indicador.

B. Uma alíquota (20 ml) de uma solução polissacarídica (5mg/ml) foi aplicada em coluna (35 X 1,6 cm de d.i.) de DEAE-celulose, forma Cl^- , previamente recuperada da maneira usual. A coluna, após lavagem com água deionizada, foi eluída com cloreto de potássio 1M até análise para carboidrato total negativa. O volume coletado foi dialisado contra água deionizada (3X) e evaporado sob pressão reduzida. A solução (20 ml) foi acidificada a

pH 2 com ácido clorídrico 1M e permaneceu por 48 horas sob refrigeração 0-20°. Após diálise contra água deionizada (2X), a fração não dialisável foi liofilizada. O polissacarídeo (49,9 mg), redissolvido em água deionizada (20 ml), foi titulado nas mesmas condições descritas no item anterior.

O equivalente de neutralização foi referido ao peso seco do polissacarídeo, segundo a seguinte expressão:

$$Eq = \frac{P \times 1000}{(V - V') \times M} \quad \text{onde,}$$

P = gramas de amostra expressos em peso seco;

M = molaridade da solução de hidróxido de sódio padronizada;

V = volume da solução de hidróxido de sódio gasto na titulação da solução polissacarídica;

V' = volume da solução de hidróxido de sódio gasto na titulação do branco;

Eq = equivalente de neutralização.

3.3. Hidrólise Ácida dos Polissacarídeos de *M. paranaguensis*.

Para uma análise qualitativa preliminar da composição química em açúcares dos polissacarídeos fracionados, foram realizados diferentes tipos de hidrólise, cada qual adequada à investigação de um tipo de monossacarídeo.

3.3.1. Açúcares neutros.

Uma amostra (10 mg) de polissacarídeo foi hidrolisada com ácido sulfúrico 0,5M (2 ml) em tubo selado, durante 12 horas à temperatura de 100°. Após hidrólise, a solução foi neutralizada com

carbonato de bário (pH 4,5) e centrifugada, para eliminação do sulfato de bário insolúvel. O sobrenadante foi deionizado pelo tratamento sequencial com resina catiônica (Dowex 50W X 8, 200-400 mesh, forma H^+) e aniônica (Amberlite IR-4B, 25-50 mesh, forma OH^-). A solução deionizada foi evaporada sob pressão reduzida e os produtos de hidrólise ácida, rediluídos a um volume adequado, foram analisados por c.p. ascendente (fase móvel **a** e visualizadores **1** e **2**).

3.3.2. Açúcares aminados.

Uma amostra (10 mg) de polissacarídeo foi submetida à hidrólise mineral forte com ácido trifluoroacético 5M, durante 12 horas à temperatura de 100°, em tubo selado sob atmosfera de nitrogênio. Após hidrólise, a solução ácida foi diluída e evaporada sob pressão reduzida, com sucessivas adições de água destilada para a eliminação total do ácido residual. Cada amostra, rediluída a um volume adequado, foi analisada por c.p. ascendente e descendente (fase móvel **a**, visualizadores **1**, **2** e **3**) e por c.f.g.-e.m. (coluna capilar DB-210, 50 → 235°, 40°/minuto).

A determinação quantitativa de hexosaminas foi realizada sobre os produtos de hidrólise ácida do polímero com ácido clorídrico 6M, por 8 horas a 100°, condições nas quais um melhor rendimento destas unidades foi obtido.

3.3.3. Açúcares ácidos.

Uma amostra (10 mg) de polissacarídeo foi submetida à hidrólise ácida com ácido sulfúrico 0,5M (2 ml), em tubo selado, durante 18 horas à temperatura de 100°. Após hidrólise, a solução foi neutralizada com carbonato de bário e o sal insolúvel

eliminado por centrifugação. O sobrenadante foi evaporado sob baixa pressão, rediluído a um volume adequado e analisado por c.p. ascendente (fase móvel **b**, visualizadores **1**, **2** e **4**).

Os açúcares ácidos foram também investigados nos hidrolisados ácidos obtidos com ácido trifluoroacético 1M, 2M e 4M, durante 12 horas a 100°. O ácido trifluoroacético foi eliminado das preparações como descrito anteriormente e as amostras foram analisadas por c.c.d. (fase móvel **d**, visualizador **2**).

3.4. Redução e Acetilação dos Produtos de Hidrólise Ácida dos Polissacarídeos de *M. paranaguensis*.

Os açúcares redutores de cada polissacarídeo, previamente hidrolisado, foram reduzidos, em meio aquoso, com excesso de boroidreto de sódio (pH 9-10), durante aproximadamente 5 horas à temperatura ambiente. Após redução, o excesso de boroidreto de sódio foi destruído pela adição de ácido acético 2M, até ausência de borbulhamento (pH 4 a 5). A solução foi então evaporada sob pressão reduzida à secura, numa temperatura média de 50°. O ânion borato, formado pela destruição do agente redutor, foi eliminado, devido ao seu caráter inibidor da etapa de acetilação, por sucessivas co-destilações com metanol (5 ml) (6X), sob pressão reduzida. O acetato de sódio, ao contrário ao ânion borato, atua eficientemente como catalisador na acetilação. A formação do acetato de sódio foi assegurada pelo deslocamento do cátion, presente na forma de borato, através da adição de ácido acético glacial (2 gotas) à primeira co-destilação com metanol. Tal estratégia, além de simplificar a técnica, afasta a possibilidade de perdas por afinidade iônica ou diluição, ao serem utilizadas resinas trocadoras de íons.

Os alditóis resultantes foram acetilados com 2 ml de uma mistura de piridina-anidrido acético, 1:1 (v/v), durante 12 horas à temperatura ambiente, na presença do acetato de sódio formado na etapa anterior. A acetilação foi complementada pelo aquecimento à temperatura de 100°, por 30 minutos. A reação foi então interrompida pela adição de água e gelo em excesso e os alditóis acetilados extraídos numa partição clorofórmio-água. A piridina residual foi eliminada, sob forma de sulfato de piridônio, por lavagens sucessivas da fase clorofórmica com solução de ácido sulfúrico 0,01M (5X) e água destilada (8X). O clorofórmio foi evaporado por destilação sob pressão reduzida, a temperaturas inferiores a 40° e a mistura de alditóis acetilados redissolvida em clorofórmio anidro, para análise cromatográfica por c.f.g. (coluna convencional OV-225, 190°).

3.5. Metilação da Fração Polissacarídica OP-I.

Uma amostra (20 mg) do polissacarídeo foi tratada com boridreto de sódio (pH 9-10), durante 12 horas à temperatura ambiente. Após redução, a solução alcalina foi neutralizada com ácido acético 2M em banho de gelo (0-2°) e dialisada contra água destilada (3X). A fração não dialisável foi evaporada até a secura e, posteriormente, submetida à metilação com sulfato de dimetila em solução alcalina, como descrito por HAWORTH⁶⁷.

De acordo com este processo, o polissacarídeo reduzido foi dissolvido em água destilada (1 ml) e metilado por sucessivas adições de hidróxido de sódio a 40% (0,2 ml) e sulfato de dimetila (0,1 ml), em intervalos de 10 minutos, durante 3 horas. A solução metilante permaneceu sob vigorosa agitação magnética por 18 horas, à temperatura ambiente, quando a reação foi in-

terrompida por neutralização com ácido acético 2M a 0-20. O pH da solução manteve-se alcalino durante todo o período e, eventualmente, pequenos volumes de acetona foram adicionados, evitando que a metilação gradativa do polissacarídeo tornasse-o insolúvel no meio aquoso. A solução, após diálise contra água destilada (3X), foi evaporada até a secura e o polissacarídeo parcialmente metilado novamente submetido ao método.

Após sucessivas metilações pelo processo acima descrito (3X), o material foi liofilizado e seguiu à metilação pelo tratamento com óxido de prata e iodeto de metila, segundo o processo descrito por PURDIE e modificado por KUHN *et al.*⁷⁵.

O material liofilizado foi dissolvido em *N,N'*-dimetilformamida (2 ml), com auxílio de leve aquecimento em banho-maria. À solução resultante foram adicionados iodeto de metila (2 ml) e óxido de prata (1 grama) e o sistema permaneceu sob vigorosa agitação, à temperatura ambiente e na ausência de luz. Duas novas adições de óxido de prata (1 grama) foram realizadas em intervalos de 24 horas. Decorridas 72 horas, o processo foi interrompido pela extração do material metilado com excesso de diclorometano, seguida por filtração em papel e evaporação do solvente. O polissacarídeo, após ser submetido novamente ao método, foi convertido nos respectivos acetatos de alditóis parcialmente metilados, como será descrito na seção 3.7.

3.6. Redução com LiAlH_4 do Polissacarídeo OP-I Metilado.

Uma amostra do polissacarídeo metilado (20 mg), de acordo com os processos descritos na seção anterior, foi solubilizada em tetrahidrofurano (Merck) e submetida ao tratamento com hi

dreto de lítio e alumínio⁹ (50 mg). O agente redutor foi adicionado em excesso até ausência de borbulhamento, provavelmente devido a ligeira hidratação do solvente orgânico. Decorridas 18 horas à temperatura ambiente, o hidreto de lítio e alumínio foi destruído pela lenta adição de acetato de etila a 0-20°, seguida de água destilada, até ausência de borbulhamento. A mistura, acidificada com ácido acético glacial, foi adicionado clorofórmio em excesso (3 vol.). Após filtração e eliminação do solvente por destilação, o polissacarídeo metilado carboxi-reduzido foi convertido aos respectivos acetatos de alditóis parcialmente metilados, como descrito na seção 3.7. .

3.7. Análise dos Produtos de Hidrólise Ácida do Polissacarídeo OP-I Metilado.

Uma amostra do polissacarídeo metilado (5 mg) foi metanolizada com HCl-metanol 1M, durante 4 horas, sob refluxo em banho-maria fervente. O sistema foi mantido isento de umidade pela adaptação de um recipiente contendo Drierite, na extremidade do condensador. A solução metanolizada foi neutralizada com carbonato de prata e o sal insolúvel eliminado por filtração em papel. Após evaporação até a secura, os metil glicosídeos parcialmente metilados foram submetidos à hidrólise mineral, com ácido sulfúrico 1M, durante 12 horas a 100°. Após hidrólise, a solução foi neutralizada com carbonato de bário, centrifugada e o sobrenadante tratado com boroidreto de sódio (pH 9-10), durante 12 horas à temperatura ambiente. A solução, neutralizada com ácido acético 2M a 0-20°, foi evaporada até a secura em temperaturas inferiores a 40°. Os íons sódio foram convertidos em acetato de sódio, enquanto que os íons borato foram eliminados

pela co-destilação com metanol, como descrito anteriormente.

A acetilação dos alditóis parcialmente metilados foi procedida pelo método convencional, com piridina e anidrido acêtico numa relação 1:1 (v/v) e os derivados acetilados extraídos numa partição clorofórmio-água. Os produtos de hidrôlise ácida do polissacarídeo metilado e do polissacarídeo metilado e reduzido, foram analisados por c.f.g. e por c.f.g.-e.m. e os cromatogramas obtidos comparados entre si.

3.8. Oxidação com NaIO_4 do Polissacarídeo OP-I.

Uma amostra (20 mg) do polissacarídeo foi submetida à oxidação com meta-periodato de sódio, numa concentração final de 0,02M (10 ml), durante 120 horas, à temperatura de 0-20° e na ausência de luz⁹⁰. A reação foi acompanhada por experimento controle, onde o metil D-galactopiranosídeo foi submetido à oxidação nas mesmas condições. Durante o período decorrido até a oxidação completa das amostras, o consumo de meta-periodato de sódio, requerido no processo oxidativo, foi determinado por titulação iodométrica reversa⁹⁰. O ácido fórmico¹⁰ e o formaldeído¹¹⁴ liberados na reação também foram investigados. Os resultados foram relacionados ao peso seco do polissacarídeo e expressos em termos de mol de açúcar anidro, cujo peso molecular representa a média ponderada dos pesos moleculares das unidades constituintes do polímero.

3.8.1. Determinação do consumo de NaIO_4 .

O consumo de meta-periodato de sódio foi determinado pela titulação de alíquotas (1 ml), retiradas da solução oxidante

em diferentes intervalos de tempo, utilizando solução padronizada de tiossulfato de sódio 0,005M como titulante e amido a 1% como indicador. O consumo, expresso em termos de mol de hexose anidra, foi calculado através da seguinte expressão:

$$C = \frac{(B-A) \times V_t \text{ da solução oxidante} \times M' \times PM}{\text{alíquota titulada (ml)} \times \text{amostra (mg)} \times 1000}, \text{ onde,}$$

B = volume de tiossulfato de sódio gasto para a titulação de alíquotas do branco;

A = volume de tiossulfato de sódio gasto para a titulação de alíquotas da solução oxidante que continha a amostra;

M' = molaridade da solução de tiossulfato de sódio padronizada;

PM = aproximação do peso molecular médio dos açúcares constituintes do polissacarídeo, calculado em função de sua composição química percentual;

C = consumo de meta-periodato de sódio por mol de açúcar anidro.

Através dos dados de consumo de meta-periodato de sódio por mol de hexose anidra e em função do tempo em que foram determinados, obteve-se uma curva de oxidação, onde o valor real do grau de oxidação do polímero foi obtido por extrapolação da inclinação da curva ao tempo zero.

3.8.2. Produção de ácido fórmico e formaldeído.

O ácido fórmico, liberado no processo oxidativo, foi determinado pela titulação de alíquotas (2 ml) da solução oxidante, como descrito na seção 1.5. . O cálculo do teor de ácido fórmico liberado por mol de açúcar anidro foi determinado pela seguinte expressão:

$$P = \frac{(A - B) \times V_t \text{ da solução oxidante} \times M'' \times PM}{\text{alíquota titulada (ml)} \times \text{amostra (mg)} \times 1000}, \quad \text{onde,}$$

A = volume de hidróxido de sódio gasto para a titulação de alíquotas da solução oxidante que continha a amostra, após o término da reação;

B = volume de hidróxido de sódio gasto para a titulação de alíquotas do branco;

M'' = molaridade da solução de hidróxido de sódio padronizada;

PM = aproximação do peso molecular médio das hexoses constituintes do polissacarídeo, calculado em função de sua composição química percentual;

P = produção de ácido fórmico por mol de açúcar anidro.

Na determinação titulométrica de ácido fórmico, não foi considerada a percentagem de sulfato presente na molécula.

A liberação de formaldeído no processo oxidativo foi investigado colorimetricamente, como descrito na seção 1.5.

3.9. Degradação Tipo Smith do Polissacarídeo OP-I.

Uma amostra do polissacarídeo foi oxidada com meta-periodato de sódio, como descrito na seção anterior. Decorridas 120 horas de reação, o excesso de agente oxidante foi eliminado pela adição de etileno-glicol (1 ml) e a solução, contendo o polissacarídeo oxidado, foi dialisada contra água corrente. Os polialdeídos não dialisáveis foram tratados com boroidreto de sódio (pH 9-10), durante 12 horas à temperatura ambiente. Após neutralização com ácido acético 2M a 0-20°, a solução foi novamente dialisada contra água destilada (3X). A fração não dialisável foi evaporada até a secura e submetida à hidrólise ácida com ácido sulfúrico 0,5M (2 ml) por 7 horas a 100°. Após hi

drólise, a solução ácida foi neutralizada com carbonato de bário (pH 4,5) e centrifugada. O sobrenadante teve seu volume reduzido por evaporação e uma parte dele foi analisada por c.p. ascendente (fase móvel a, visualizadores 1, 2 e 3).

O material hidrolisado restante, derivatizado a acetato de alditol como previamente descrito, foi analisado por c.f.g. (coluna convencional ECNSS-M), sob programação de temperatura (120-180º, 4º/minuto).

3.10. Reações de Aglutinação Específicas entre Lectinas e a Fração OP-I.

As propriedades imunoquímicas da fração polissacarídica isolada de oviduto-próstata de *M. paranaguensis* foram investigadas, em colaboração com o Professor Uhlenbruck (Colônia, Alemanha), através de reações de aglutinação com lectinas específicas às unidades terminais não redutoras de fucose ou galactose.

As lectinas específicas para unidades de D-galactose terminais não redutoras foram isoladas de *Geodia cynodium* (espécie de esponja) e de *Tridacna gigas* (espécie de ostra), enquanto que as específicas para unidades de L-fucose terminais não redutoras foram isoladas de soro de *Anguilla anguilla* (espécie de enguia) e das sementes de duas plantas leguminosas, *Lotus tetragonolobus* e *Ulex europaeus*.⁶⁰

3.11. Carboxi-redução da Fração OP-I.

A carboxi-redução da fração OP-I (8 mg) foi realizada utilizando cloridrato de 1-etil-3(3-dimetilaminopropil)carbodiimida como agente ativante, e boroidreto de sódio, como agente redutor, segundo o processo descrito por TAYLOR & CONRAD¹⁰⁹.

III. RESULTADOS E DISCUSSÃO

1. ISOLAMENTO DA FRAÇÃO POLISSACARÍDICA DE OVIDUTO-PRÓSTATA DE *M. paranaguensis*.

Dos moluscos Gastropoda coletados no litoral paranaense (Antonina), foram selecionados para a dissecação do oviduto-próstata apenas os espécimes adultos de grande porte. Os meses mais favoráveis à coleta foram os de março a outubro.

Aproximadamente quatrocentos espécimes de *M. paranaguensis* foram utilizados na presente investigação.

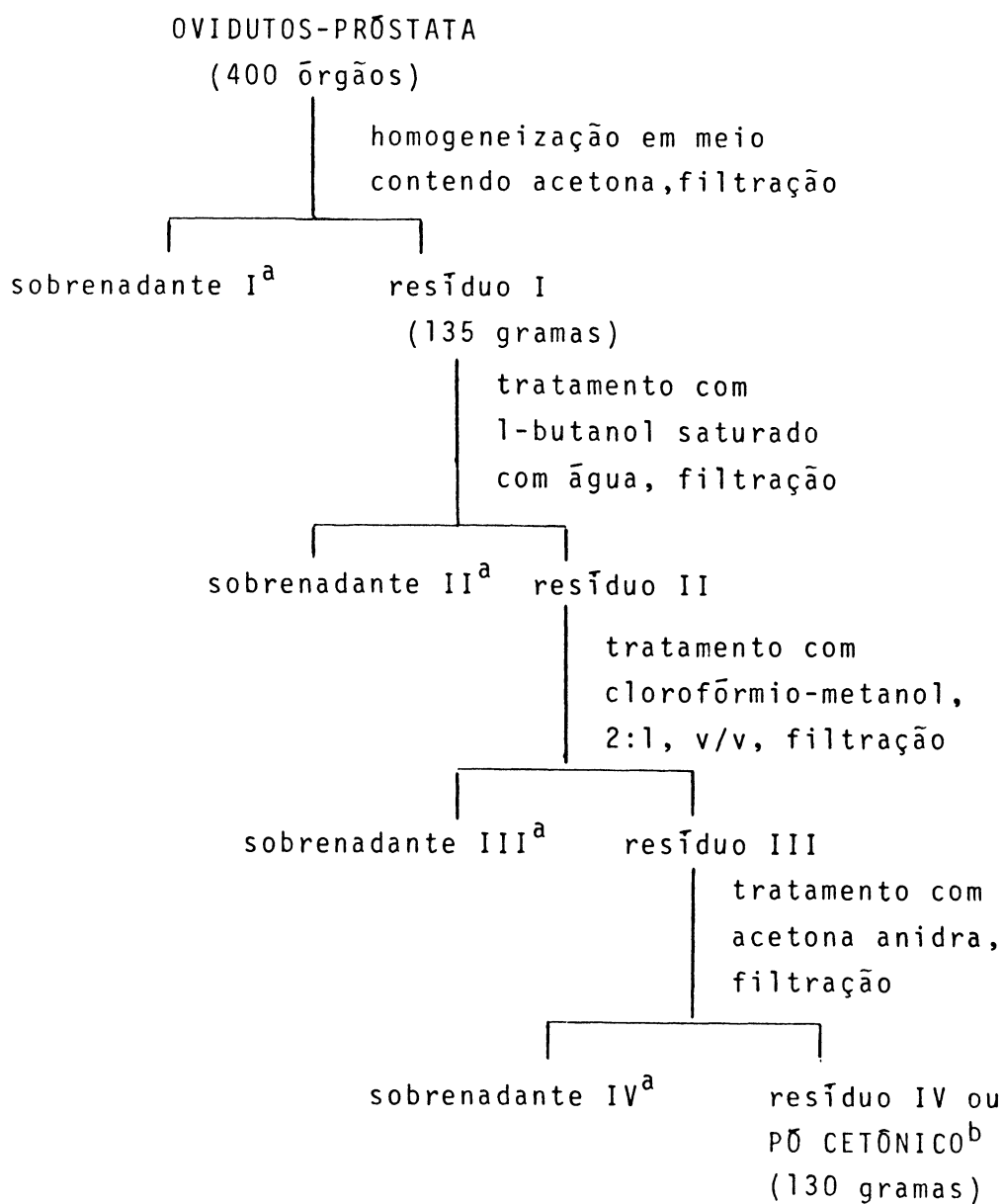
Os órgãos (ovidutos-próstata), recentemente dissecados, foram lavados em água destilada, transferidos para um recipiente contendo acetona e homogeneizados em liquidificador, a fim de eliminar pigmentos e de inibir atividades enzimáticas que pudessem alterar a natureza de seu conteúdo em carboidratos.

As etapas envolvidas no isolamento da fração polissacarídica de oviduto-próstata de *M. paranaguensis* estão representadas no Esquema B.

A delipidificação do resíduo I (135 gramas) foi realizada através de tratamentos sucessivos com *n*-butanol saturado com água e com uma mistura de clorofórmio-metanol, 2:1, v/v, como descrito em materiais e métodos.

A fração lipídica, solúvel em clorofórmio, correspondeu

ESQUEMA - B

ISOLAMENTO DA FRAÇÃO POLISSACARÍDICA
DE OVIDUTO-PRÓSTATA DE *M. paranaguensis*

- a. os sobrenadantes foram reunidos, filtrados e os solventes evaporados; o resíduo obtido foi solubilizado em clorofórmio, correspondendo à fração lipídica;
- b. antes de ser pesado, o pó cetônico foi seco à temperatura ambiente

a 7% do pó cetônico inicial, em termos de seu peso seco. Esta fração não foi investigada no presente trabalho.

2. PURIFICAÇÃO DA FRAÇÃO POLISSACARÍDICA DE OVIDUTO-PRÓSTATA DE *M. paranaguensis*.

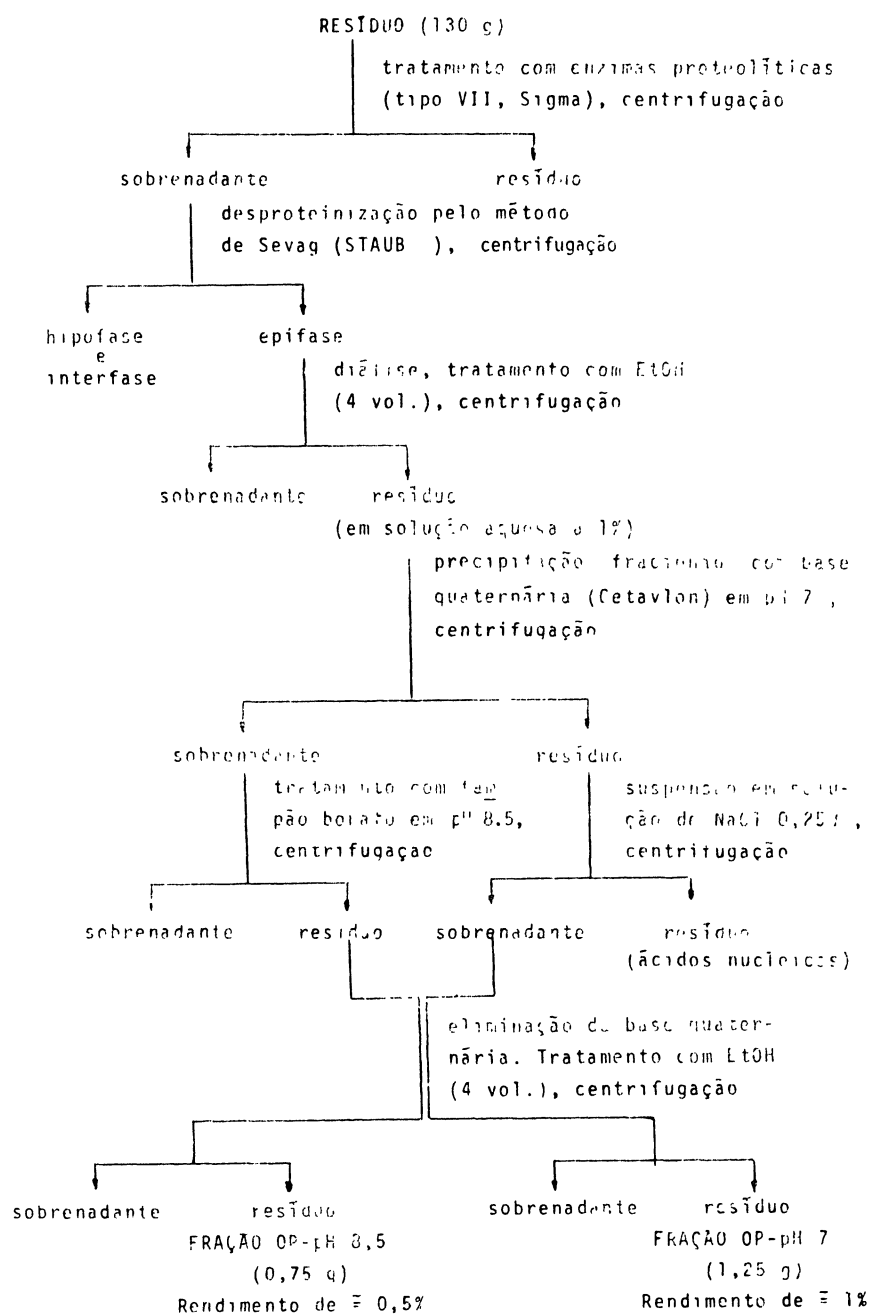
As etapas envolvidas na purificação da fração polissacarídica de oviduto-próstata de *M. paranaguensis* estão representadas no Esquema C.

O tratamento do pó cetônico com enzimas proteolíticas, complementado pelo método de desproteínização de SEVAG¹⁰⁶, permitiu a obtenção de uma fração polissacarídica de coloração branca, totalmente solúvel em água, formando soluções bastantes viscosas. O peso seco desta fração, recuperada sob a forma de pó cetônico, demonstrou a presença de 20% de água de hidratação, normalmente observada em preparações polissacarídicas. Foi também observado que a liofilização desta fração não alterou seu peso seco, que passou a servir de parâmetro quantitativo para as análises químicas posteriormente realizadas.

O teor proteico da fração polissacarídica de oviduto-próstata de *M. paranaguensis* foi investigado pelo reagente fenólico de Folin-Ciocalteu, segundo LOWRY *et al*⁸¹, após o processo de desproteínização, indicando a ocorrência de apenas 2% de proteínas em termos de seu peso seco. No entanto, a presença de proteínas não foi observada na análise desta fração por espectroscopia de r.m.n.-¹³C.

A dosagem de açúcar total, pelo método do fenol-ácido sulfúrico³⁹, na fração livre de proteínas, indicou que apenas 39,0% de seu peso seco (pó cetônico) era constituído por carboi

ESQUEMA C

PURIFICAÇÃO DA FRAÇÃO POLISSACARÍDICA DE
OVIDUTO-PRÓSTATA DE *M. paranaguensis*.

dratos dosáveis pela técnica. O baixo teor em açúcar total observado não pode ser atribuído apenas a presença de água de hidratação (20%). Entretanto, é conhecido que certas unidades constituintes de polissacarídeos amplamente difundidos na natureza, como as hexosaminas e o ácido neuramínico, não são dosadas pela técnica do fenol-ácido sulfúrico. Estas unidades são incapazes de formar furfural na presença de ácido sulfúrico concentrado, devido a presença de um grupo amino no carbono-2, condição *sine qua non* para a formação de um produto cromóforo na reação com o fenol.

Igualmente importante é o fato de que carboidratos estruturalmente distintos, quer por conformação, tamanho do anel ou presença de grupos substituintes, apresentam absorção máxima em comprimentos de onda diferenciados, muitas vezes com absortividades molares bastante distintas. Isto torna a técnica inconveniente para a aplicação no estudo de heteropolissacarídeos, sem que fatores de correção sejam levados em consideração.

Os produtos de hidrólise ácida da fração polissacarídica de oviduto-próstata de *M. paranaguensis* foram analisados por c. p. ascendente (fase móvel **a**, visualizadores **1**, **2** e **3**). Através da co-migração com padrões dos respectivos monossacarídeos, foi constatada a ocorrência de unidades de ácido urônico ($R_{Ga1} = 0,16$), hexosamina ($R_{Ga1} = 0,82$), galactose ($R_{Ga1} = 1,00$), glucose ($R_{Ga1} = 1,16$) e fucose ($R_{Ga1} = 1,54$) como constituintes do polímero (Fig.1).

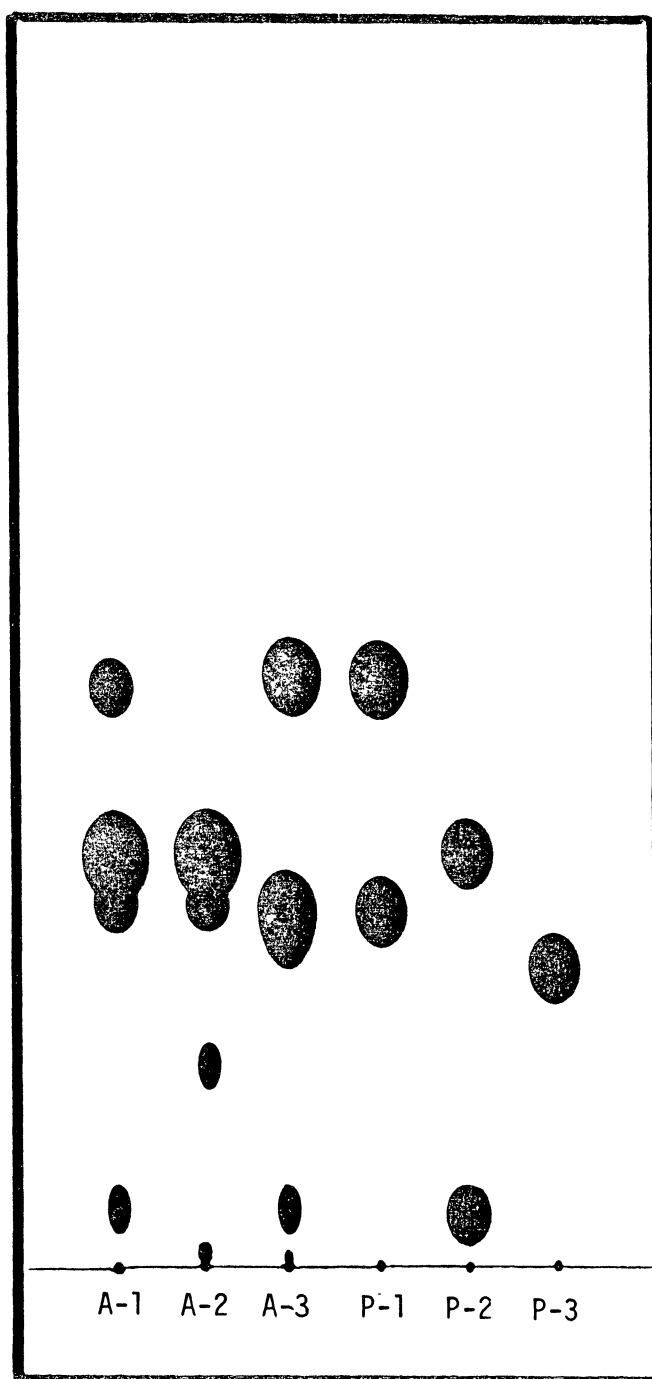


Fig. 1 - ANÁLISE POR c.p. ASCENDENTE (FASE MÔVEL a, VISUALIZADOR 1) DOS HIDROLISADOS (H_2SO_4 0,5M por 12 h a 100°) DAS FRAÇÕES POLISSARÍDICAS ISOLADAS DO OVIDUTO-PRÓSTATA DE *M. paranaguensis* POR PRECIPITAÇÃO COM CETAVLON

- A-1 Hidrólise ácida da fração OP (fração bruta)
- A-2 Hidrólise ácida da fração OP-pH 8,5
- A-3 Hidrólise ácida da fração OP-pH 7,0
- P-1 Galactose e fucose
- P-2 Ácido glucurônico e glucose
- P-3 Glucosamina

3. PRECIPITAÇÃO FRACIONADA COM BASE QUATERNÁRIA DA FRAÇÃO POLISSACARÍDICA DE OVIDUTO-PRÓSTATA DE *M. paranaguensis*.

A fração polissacarídica de oviduto-próstata de *M. paranaguensis* foi purificada por precipitação fracionada com base quaternária (Cetavlon), de acordo com o processo utilizado por DUARTE & JONES³⁶ para a purificação da galactana de glândula de albúmen de *Strophocheilus oblongus*. Duas frações distintas foram obtidas, uma em pH 7 e outra em pH 8,5 (na presença de tampão borato), com rendimentos próximos a 1 e 0,5% em termos de peso de pó cetônico, respectivamente.

A fração ácida (OP-pH 7), sob a forma de complexo polissacarídeo-base quaternária, foi tratada com cloreto de sódio 0,25M para a eliminação de ácidos nucleicos (Esquema C). Nessas condições, a competição entre os íons cloreto e o polieletrólito pelo sítio eletrofílico da base quaternária, favorece apenas a descomplexação de interações iônicas fracas; por conseguinte, somente complexos do tipo polissacarídeo-base quaternária são cindidos, enquanto que complexos do tipo ácido nucleico-base quaternária, que envolvem interações iônicas mais fortes, permanecem na forma de complexo insolúvel e podem ser eliminados por centrifugação. A fração polissacarídica OP-pH 7, contida no sobrenadante, foi recuperada pelo tratamento com etanol (4vol.) e o precipitado, obtido por centrifugação, foi lavado com etanol para a eliminação da base quaternária.

A fração OP-pH 7 foi então submetida à hidrólise ácida (ácido sulfúrico 0,5M, por 12 horas a 100°) e seus produtos de reação analisados por c.p. ascendente (fase móvel a, visualizador

1). Desta forma, quatro componentes foram observados, com R_{Gal} de 0,16, 0,83, 1,00 e 1,55. Suas migrações cromatográficas foram equivalentes às observadas para padrões de ácido urônico, hexosamina, galactose e fucose, respectivamente. (Fig. 1)

Os derivados acetilados dos produtos de hidrólise ácida (açúcares neutros) da fração OP-pH 7 foram analisados por c.f.g. (coluna convencional OV-225, 190°), confirmando a presença de unidades de fucose e galactose, numa relação molar de 1:1 (Fig. 2). Este resultado contraria a relação molar de 0,53:1 em unidades de fucose e galactose, obtida por IACOMINI *et al.*⁷¹ para a fração OP-pH 7 de *M. paranaguensis*. A natureza desta discordância não foi bem esclarecida.

A fração neutra (OP-pH 8,5) foi precipitada na forma de um complexo polissacarídeo-borato-base quaternária. A descomplexação foi realizada por sucessivas lavagens do precipitado com ácido acético 2M, seguido de tratamento com etanol (4 vol.), para eliminação da base quaternária e recuperação do polissacarídeo por centrifugação.

Os produtos de hidrólise ácida (ácido sulfúrico 0,5M, por 12 horas a 100°) da fração OP-pH 8,5 foram analisados por c.p. ascendente (fase móvel a, visualizador 1). Dois componentes foram observados, com valores de R_{Gal} de 1,15 e 1,00, compatíveis à co-migração de padrões de glucose e galactose, respectivamente. (Fig. 1).

A análise por c.f.g. (coluna convencional OV-225, 190°) dos açúcares neutros desta fração, na forma de polióis acetilados, demonstrou uma relação molar de 4:1 entre unidades de glucose e galactose. Não foram investigados aspectos estruturais deste polissacarídeo, no presente trabalho.

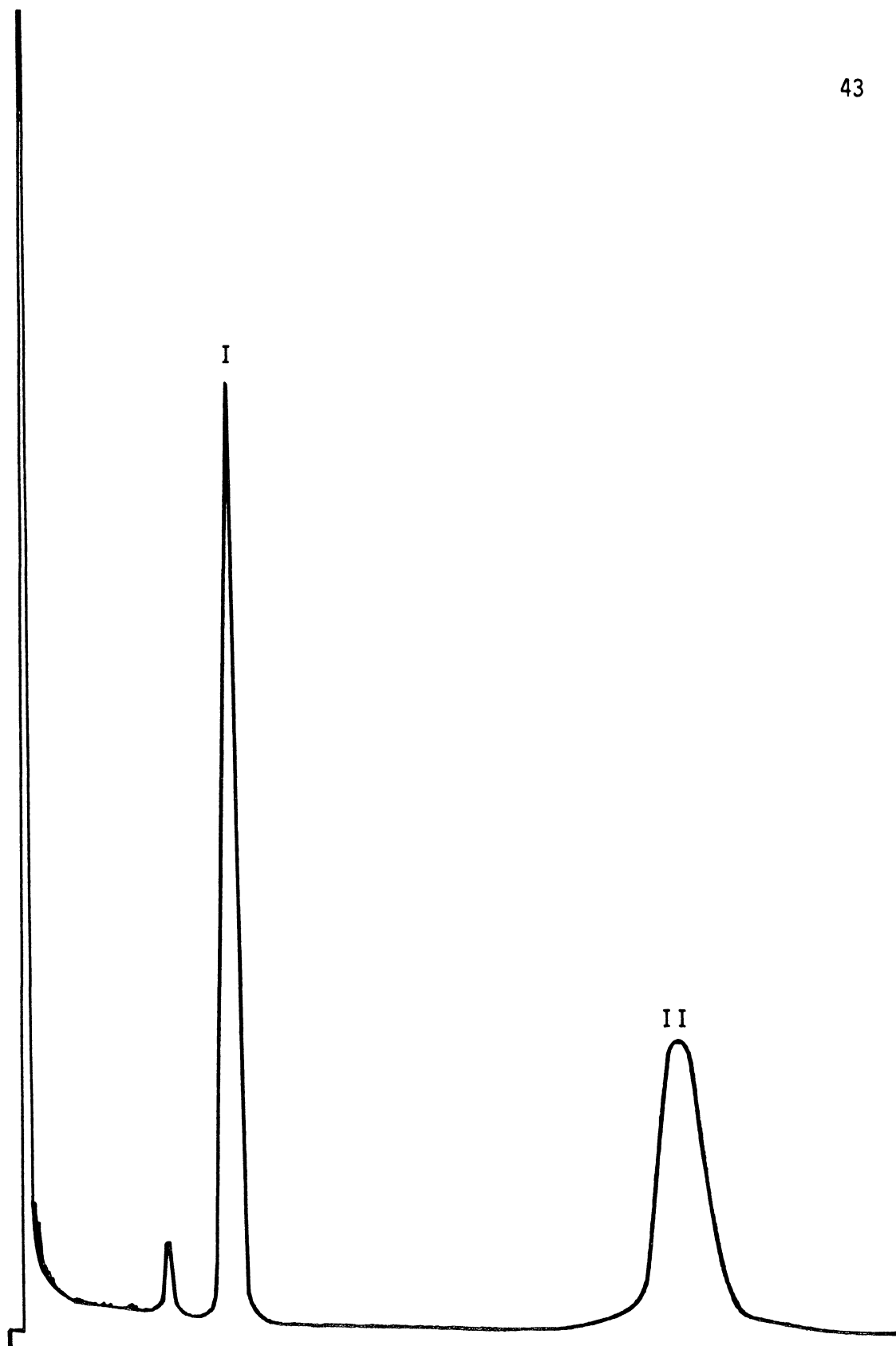


Fig. 2 - ANÁLISE DOS PRODUTOS DE HIDRÓLISE ÁCIDA (H_2SO_4 0,5M POR 12 h a 100°) DA FRAÇÃO OP-pH 7 POR c.f.g. (COLUNA OV-225 A 3% EM CHROM. Q, 190°), NA FORMA DE ACETATOS DE ALDITÓIS.

I - fucitol penta-*O*-acetato
II - galactitol hexa-*O*-acetato

Estudos realizados por PONTAROLO⁹⁴ numa fração polissacarídica contendo galactose e glucose, isolada de placenta bovina, demonstraram que tal fração não era formada por um heteropolissacarídeo, mas por uma galactana complexada com glicogênio.

4. HOMOGENEIDADE DA FRAÇÃO POLISSACARÍDICA DE OVIDUTO-PRÓSTATA DE *M. paranaguensis*.

A homogeneidade da fração polissacarídica OP-pH 7 foi testada por cromatografia de filtração em gel, utilizando peneiras moleculares BIO-GEL (BIO-RAD) com limites de exclusão de 30 mil (P-30 mil), 100 mil (P-100 mil), 1,5 milhões (A-1,5 milhões) e 5 milhões (A-5 milhões) de daltons. Em BIO-GEL P-30 e P-100 mil, uma amostra desta fração foi totalmente excluída do leito cromatográfico. O perfil de eluição nestes géis pode ser observado nas Figuras 3-A e 3-B, respectivamente. Em BIO-GEL A-1,5 milhões, a amostra foi eluída logo após o volume morto da coluna. Porém, o perfil de eluição neste gel, representado na Figura 3-C, não foi esclarecedor. Em BIO-GEL A-5 milhões, a amostra foi totalmente incluída, apresentando um perfil de eluição caracterizado por uma distribuição homogênea em um único pico, como demonstra a Figura 3-D. Nas condições experimentais utilizadas, tanto em BIO-GEL A-1,5 como em A-5 milhões, não foi observada nenhuma dissociação da fração polissacarídica OP-pH 7.

Atualmente, tem sido comprovado por vários autores que heteropolissacarídeos ácidos de ocorrência natural constituem famílias

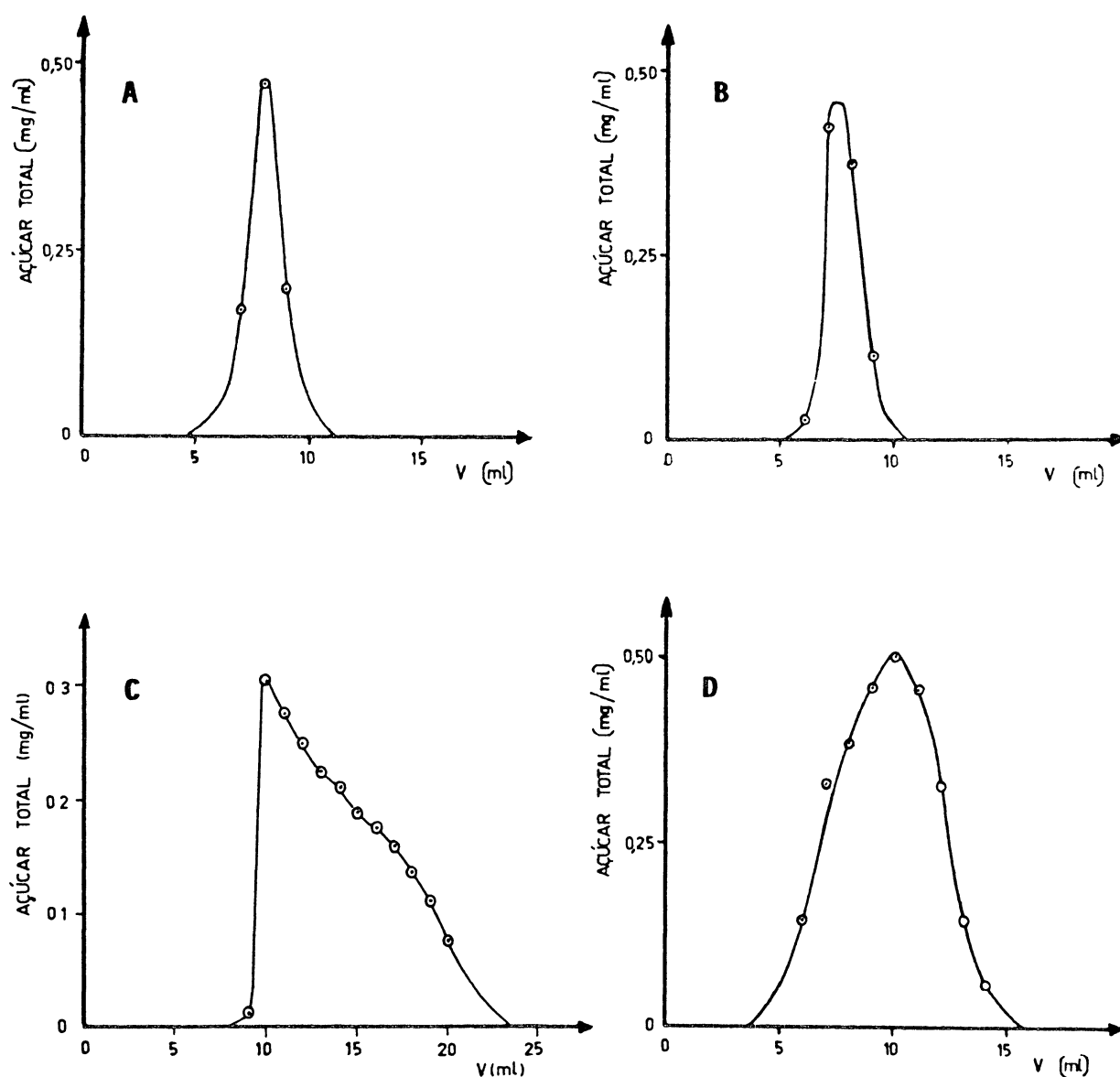


Fig. 3 - INVESTIGAÇÃO DA HOMOGENEIDADE DA FRAÇÃO OP-pH 7 POR FILTRAÇÃO EM GEL DE AGAROSE

Amostras (10 mg) da fração OP-pH 7 foram cromatografadas em colunas (30 x 1,0 cm de d.i.) de Bio-gel com diferentes limites de exclusão. Acetato de amônia foi utilizado como eluente (fluxo médio de 90 ml/h). As alíquotas coletadas (1 ml) foram analisadas para carboidrato total e o volume morto foi determinado pela aplicação de azul de dextrana.

A - Bio-Gel P-30 ml, $V_o = 7$ ml.

B - Bio-Gel P-100 ml, $V_o = 8$ ml.

C - Bio-Gel A-1,5 milhões, $V_o = 10$ ml.

D - Bio-Gel A-5 milhões.

de polímeros relacionados, com diferenças na distribuição de substituintes portadores de carga na macromolécula.

REES e colaboradores^{4,5,93}, investigando aspectos estruturais das carragenanas (galactanas isoladas de algas rodófitas), classificaram-nas em seis frações distintas, ao invés das duas anteriormente descritas¹⁰⁵. Estas galactanas apresentaram variações no posicionamento dos grupos sulfato, bem como na proporção entre estes grupos e as unidades de 3,6-anidro-D-galactose. Assim, estas variações estruturais permitiram a estes pesquisadores a separação dos diferentes polímeros que constituem a carragenana, por cromatografia de troca iônica.

Da mesma forma, DUCKWORTH & YAPHE^{41,42}, investigando a homogeneidade de uma amostra comercial de ágar (Difco) em coluna de DEAE-Sephadex A-50, demonstraram que o mesmo é constituído por uma mistura complexa de vários polissacarídeos com a mesma estrutura básica, que apresentam variações quanto a localização e distribuição dos grupos portadores de carga.

As glicosaminoglicanas (mucopolissacarídeos), macromoléculas que ocorrem numa grande variedade de organismos, exercem particular importância no tecido conectivo de mamíferos, onde diferentes tipos têm sido observados.

LINKER & HOVINGH⁷⁷, estudando a caracterização de uma destas frações mucopolissacarídicas, demonstraram que o sulfato de heparitin não é um composto simples, mas constitui uma família de polímeros relacionados, que apresentavam variações no teor de sulfato e na distribuição de cargas na macromolécula.

Portanto, em cromatografia de troca iônica de heteropolissacarídeos ácidos, tem sido observado⁷⁷ que a afinidade de um polímero pelo leito cromatográfico será proporcional ao seu caráter ácido, propriedade que, bem explorada, permite a obtenção de subfrações quimicamente homogêneas, aptas para estudos estruturais.

Levando em consideração os resultados obtidos por estes autores, a fração heteropolissacarídica sulfatada, OP-pH 7, foi submetida à cromatografia de troca iônica em coluna de DEAE-celulose (forma Cl^-), uma dextrana parcialmente substituída em 0-6 das unidades de D-glucose pelo radical dietilaminoetil (base quaternária).

Uma tentativa de fracionamento da fração OP-pH 7 em coluna de DEAE-celulose (forma Cl^-) foi realizada sob dois processos de eluição: um em gradiente contínuo (solução de cloreto de potássio 0-2M) (Fig. 4) e outro em gradiente descontínuo (água, seguida de soluções de cloreto de potássio 0,25, 0,50, 0,75, 1,00 e 2,00M) de concentração (Fig. 5). Nestes experimentos não foi observada, pelos reagentes apropriados, a presença de carboidratos na eluição com água e com hidróxido de sódio 0,1M. As análises para carboidrato total, grupo sulfato, hexosaminas e teor proteico foram realizadas apenas nas frações obtidas pela eluição com gradiente descontínuo, enquanto que o perfil de eluição com gradiente contínuo foi acompanhado apenas pela dosagem de carboidrato total. Em virtude da dificuldade de reprodutibilidade dos dados obtidos pela eluição com gradiente contínuo (ausência de controle adequado da força iônica do eluato), foi dada preferência ao segundo proces-

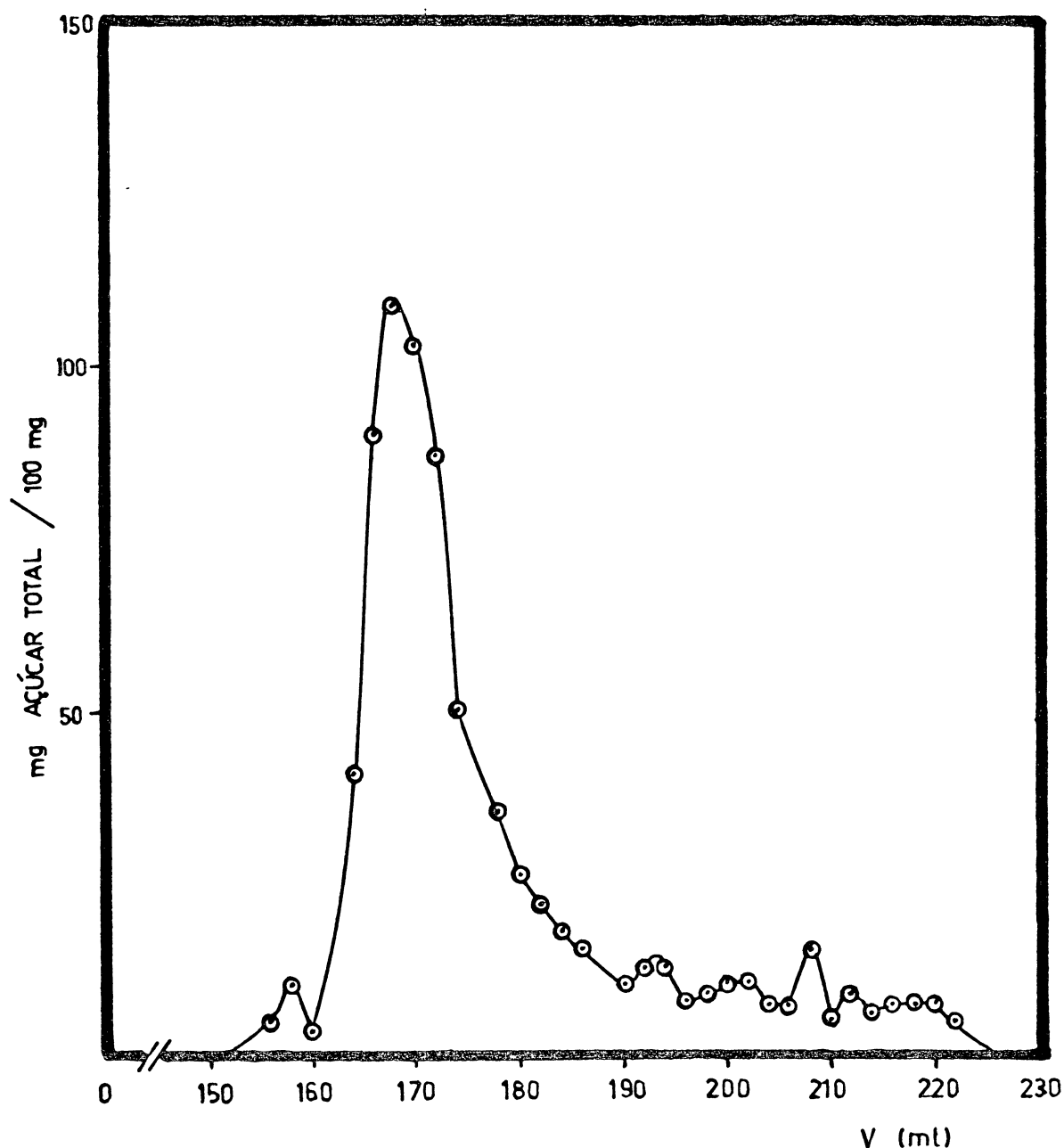


Fig. 4 - CROMATOGRAFIA DE TROCA IÔNICA DE FRAÇÃO OP-pH 7 EM DEAE-CELULOSE (FORMA Cl^-), COM ELUIÇÃO POR GRADIENTE CONTÍNUO.

Uma amostra (10 mg) da fração OP-pH 7 foi cromatografada em coluna (25 x 1,6 cm de d.i.) de DEAE-celulose (forma Cl^-) com fluxo médio de 90 ml/h, obedecendo ao seguinte esquema de eluição: (a) água; (b) gradiente contínuo de KCl de 0-2M; (c) KCl 2M e (d) NaOH 0,1M. Não foi detectada a presença de carboidratos nos eluatos (a), (c) e (d). As alíquotas coletadas (2 ml) foram analisadas para carboidrato total³⁹.

so de eluição, na purificação da fração polissacarídica OP-pH 7 por cromatografia de troca iônica.

De acordo com a Figura 5, a maior subfração polissacarídica foi eluída com solução de cloreto de potássio 0,25M (fração OP-I, 70%), enquanto que subfrações com menor rendimento foram obtidas na eluição com soluções de cloreto de potássio 0,50M (OP-II, 10%), 0,75M (OP-III, 5%), 1,00M (OP-IV, 6%) e 2,00M (OP-V, 3%).

Deste modo, somente a subfração de maior rendimento (OP-I) foi selecionada para estudos estruturais, sendo as demais subfrações investigadas com vistas à composição química.

Um estudo comparativo sobre a composição química das diferentes subfrações OP-I, OP-II, OP-III, OP-IV e OP-V, demonstrou serem elas constituídas pelos mesmos componentes, com relações molares diferenciadas, conforme os dados obtidos por c.f.g. (coluna convencional OV-225, 190°) dos produtos de hidrólise (ácido sulfúrico 0,5M a 100°) das frações (Tabela I).

Realmente, a subfração OP-II contém um maior teor em unidades de fucose, enquanto que a subfração OP-III possui a maior proporção observada em unidades de hexosamina*. Com relação à distribuição de grupo sulfato nas diferentes subfrações, foi observado que a subfração OP-I apresentou a menor proporção deste semi-éster (0,8%). Em contrapartida, a subfração OP-III apresentou o maior teor em grupo sulfato. Isto está de acordo com o comportamento cromatográfico observado para outros polissacarídeos sulfatados, onde polímeros com menor teor em grupo sulfato foram eluídos com soluções de baixa força iônica.^{41,77}

* Estimativa visual pelo método de ELSON-MORGAN, modificado por BOAS²⁰.

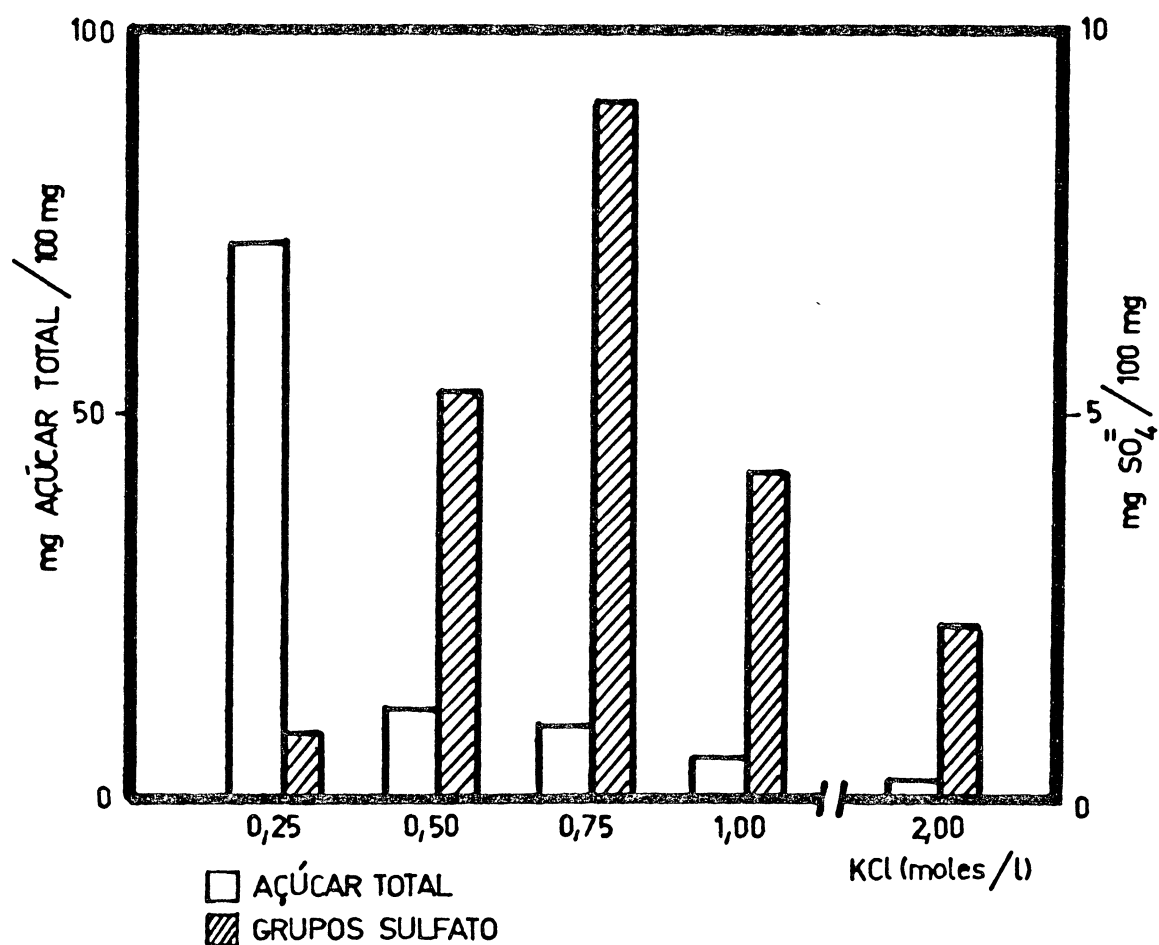


Fig. 5 - CROMATOGRAFIA DE TROCA IÔNICA DA FRAÇÃO OP-pH 7 EM DEAE-celulose (FORMA Cl^-), ELUIÇÃO POR ETAPAS

Uma amostra (100 mg) da fração OP-pH7 foi cromatografada em coluna (50 x 3 cm de d.i.) de DEAE-celulose (forma Cl^-), utilizando o seguinte esquema de eluição: (a) água; (b) eluição por etapas com concentrações crescentes de KCl (0,25M; 0,50M; 0,75M; 1,00M; 2,00M) e (c) NaOH 0,1M. Não foi detectada presença de carboidratos nos eluatos (a) e (c). As frações polissacarídicas isoladas foram analisadas para carboidrato total³⁹ e teor em grupos sulfato⁸.

TABELA I

COMPOSIÇÃO QUÍMICA DAS FRAÇÕES POLISSACARÍDICAS PURIFICADAS POR CROMATOGRAFIA DE TROCA IÔNICA.

FRAÇÃO ^a	Açúcares Neutros ^b		Açúcar Total ^c	Sulfato ^d	Proteína ^e
	Fucose	Galactose			
OP-I	50	50	46,1	0,8	0,8
OP-II	60	40	42,0	6,2	2,6
OP-III	33	67	41,2	10,7	1,7
OP-IV	25	75	43,7	5,0	-
OP-V	20	80	39,8	2,8	-

^a Frações polissacarídicas obtidas no fracionamento do polímero OP-pH 7 em coluna de DEAE-celulose (forma Cl^-), sob eluição em etapas com concentrações crescentes de KCl: 0,25M, OP-I; 0,5M, OP-II; 0,75M, OP-III; 1,00M, OP-IV; 2,00M, OP-V;

^b Relações molares aproximadas, obtidas pela análise por c.f.g. (coluna convencional OV-225 a 3% em Chrom Q, 1909) dos produtos de hidrólise ácida (H_2SO_4 0,5M por 12 h a 100°) das diferentes frações, na forma de acetatos de alditóis;

^c Dosado pelo método de fenol-ácido sulfúrico, descrito por DUBOIS *et al.*³⁹ e expresso em termos de peso seco das frações;

^d Dosado pelo método da benzidina, segundo ANTONOPOULOS⁶ e expresso em peso seco das frações;

^e Determinada através do reagente fenólico de Folin-Ciocalteu pelo método de LOWRY *et al.*⁸¹.

O processo de purificação em DEAE-celulose da fração OP-pH 7 permitiu a obtenção de subfrações polissacarídicas com teores variáveis de proteína, sendo que a fração selecionada para estudos estruturais (OP-I) apresentou um teor proteico de 0,8%, aproximadamente quatro vezes inferior ao do polímero original, obtido pela precipitação com base quaternária.

Em resumo, as diferentes subfrações, obtidas do oviduto-próstata de *M. paranaguensis* por cromatografia de troca iônica (DEAE-celulose), provavelmente não constituem polissacarídeos distintos, mas uma família de polissacarídeos que contém uma mesma estrutura básica, com proporções diferenciadas entre suas unidades. Os dados são ainda insuficientes para diferenciá-las sob critério de polimolecularidade e/ou polidispersidade.

5. COMPOSIÇÃO QUÍMICA QUALITATIVA DA FRAÇÃO OP-I

A análise por c.p. ascendente (fase móvel **a**, visualizadores **1, 2, 3**) dos produtos de hidrólise ácida da fração OP-I (ácido trifluoroacético 1M, por 12 horas a 100°), assinalou a ocorrência de unidades de fucose, galactose, hexosamina e ácido urônico como constituintes no polímero, identificadas pela comigração com os respectivos padrões, nas mesmas condições (Fig. 6).

O rendimento em unidades de hexosamina e ácido urônico não foi apreciável (Fig. 6), devido às condições de hidrólise empregadas visarem principalmente a liberação dos açúcares neutros da fração.

Este hidrolisado, quando analisado por c.f.g. (coluna

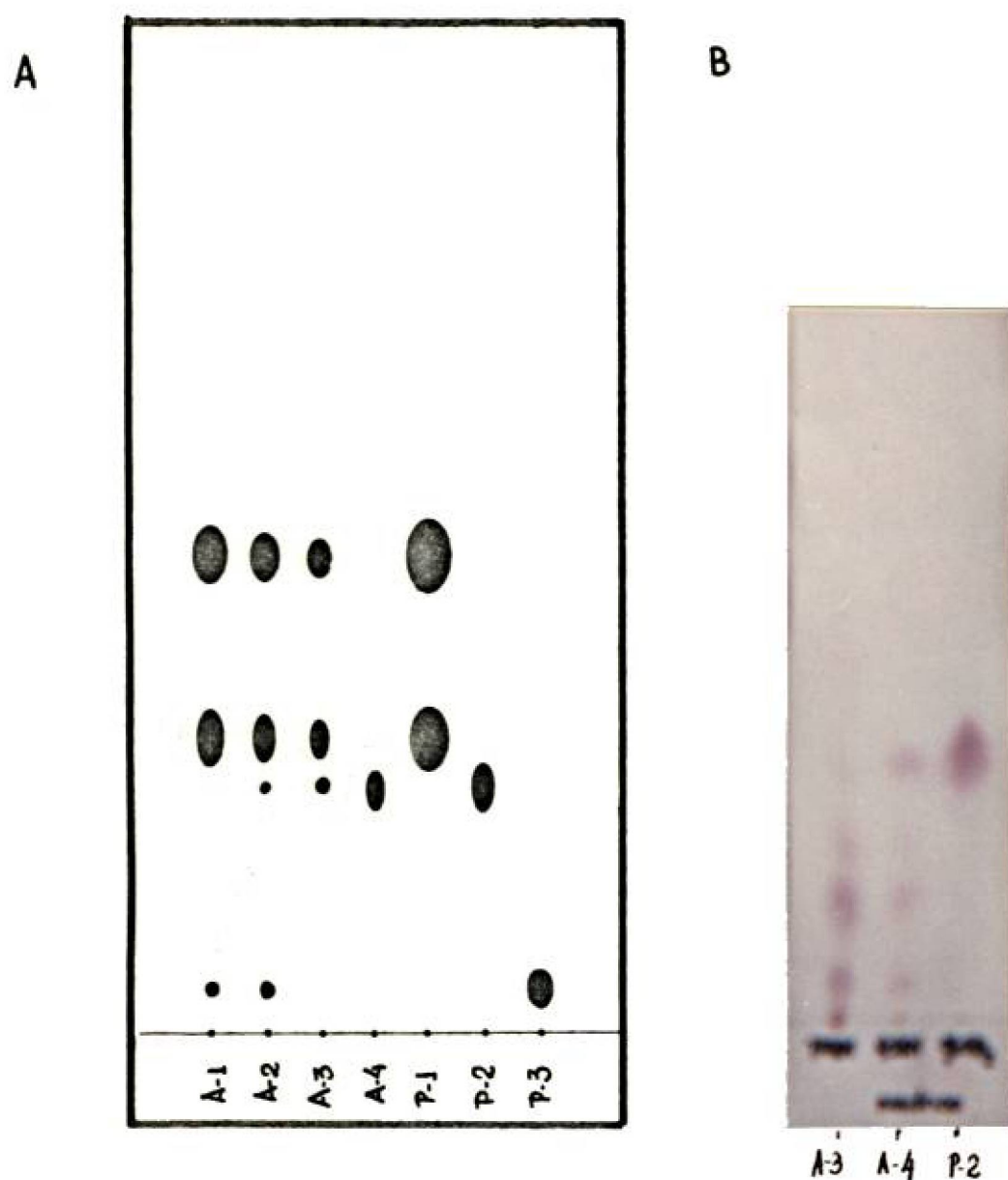


Fig. 6 - ANÁLISE POR c.p. ASCENDENTE (FASE MÓVEL a, VISUALIZADORES 1 E 3) DOS PRODUTOS DE HIDRÓLISE ÁCIDA DA FRAÇÃO OP-1.

A - visualizador 1 (nitrato de prata alcalino)

B - visualizador 3 (ninidrina a 0,2% em acetona)

Padrões:

P-1 galactose e fucose
P-2 cloridrato de glucosamina
P-3 ácido glucurônico

Amostras hidrolisadas:

A-1 ácido trifluoroacético 1M por 12 h a 100°
A-2 ácido trifluoroacético 4M por 12 h a 100°
A-3 ácido trifluoroacético 6M por 12 h a 100°
A-4 ácido clorídrico 6M por 8 h a 100°

convencional OV-225, 190º), na forma de acetatos de alditóis , confirmou a ocorrência de fucose e galactose como açúcares neutros. Os tempos de retenção (T) e a quantificação relativa destas unidades foram determinados utilizando o arabinitol penta-O-acetilado como padrão interno (Fig. 7). Nas condições utilizadas, hexosaminas e ácidos urônicos não podem ser detectados.

A mesma composição em açúcares neutros foi determinada pela análise do hidrolisado da fração OP-I por c.f.g.-e.m., utilizando coluna capilar DB-210 (50 → 235, 40º/minuto). Os espectros de massa (i.e.), corresponderam aos perfis de fragmentação de fucitol (m/e 145, 217, 231, 289, 303), I , e galactitol (m/e 145, 217, 289, 361) per-O-acetilados⁷³, II (Fig. 8-A).

Realmente, a análise das frações OP-pH 7 e OP-I por espectroscopia r.m.n.-¹³ C , confirmou a presença de fucose pela atribuição do sinal em δ 17,1 ao carbono metílico (CH₃) destas unidades^{61,63,103} (Fig's 9 e 17).

A ocorrência de unidades de hexosamina nos produtos de hidrólise ácida da fração OP-I foi determinada por diferentes processos analíticos.

A análise por c.p. ascendente (fase móvel a, visualizados 1 e 3) dos produtos de hidrólise ácida da fração OP-I (Fig. 6), obtidos por tratamento com ácido clorídrico 6M por 8 horas a 100º, demonstrou que estas condições, apesar de causarem a destruição parcial dos açúcares neutros, fornecem um bom rendimento em açúcares aminados. Outras condições de hidrólise não apresentaram rendimento apreciável, conforme será discutido posteriormente. Neste cromatograma, a hexosamina foi comprovada por reagentes positivos para carboidratos¹¹³ e para compostos a²⁹minados .

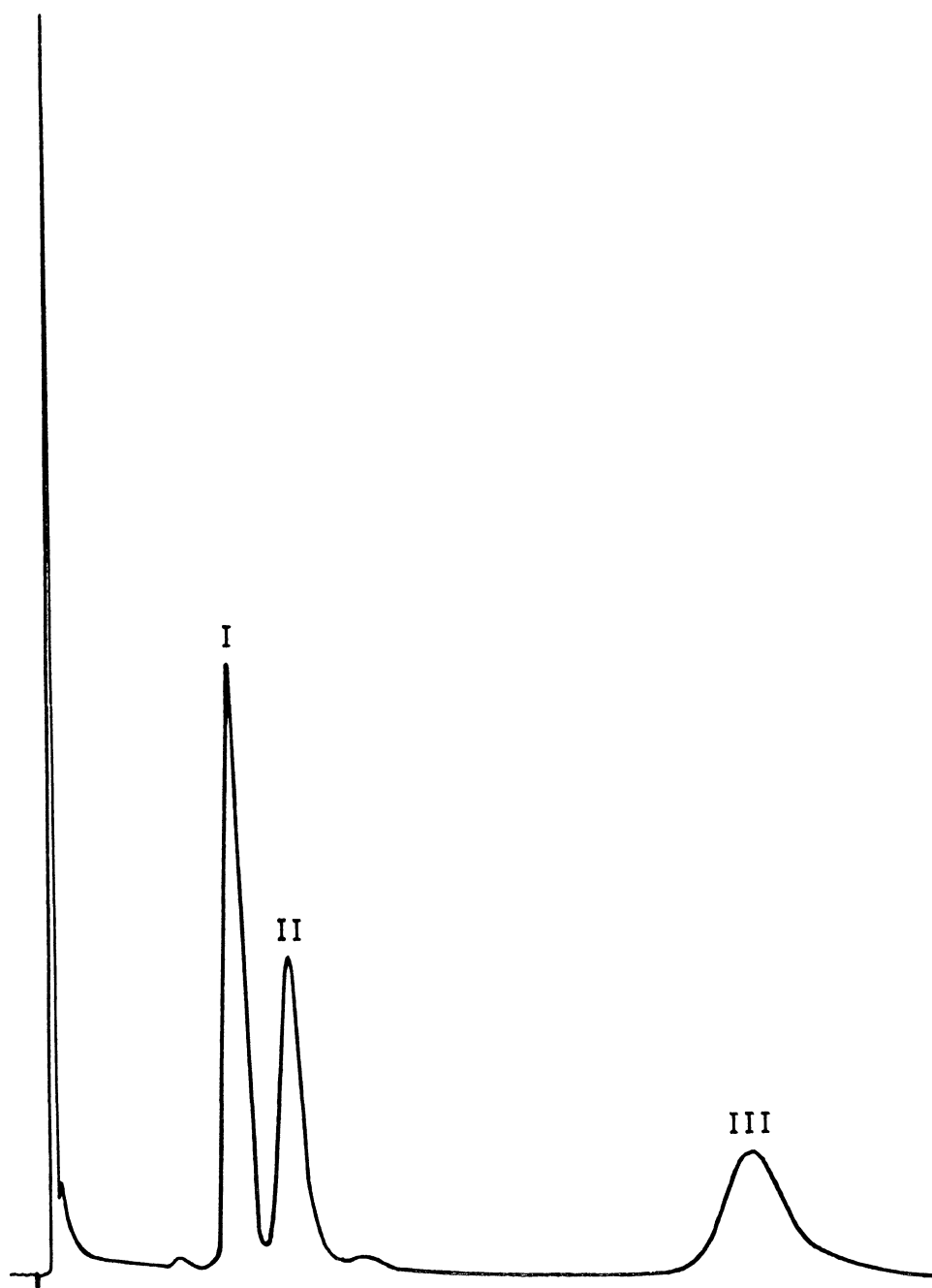


Fig. 7 - ANÁLISE DO HIDROLISADO DA FRAÇÃO OP-I (H_2SO_4 0,5M POR 12 h A 100°) POR c.f.g. (COLUNA CONVENCIONAL OV-225 A 3% EM CHROM. Q, 190°), NA FORMA DE ACETATOS DE ALDITÓIS.

- I - fucitol penta-*O*-acetato
- II - arabinitol penta-*O*-acetato (padrão interno)
- III - galactitol hexa-*O*-acetato

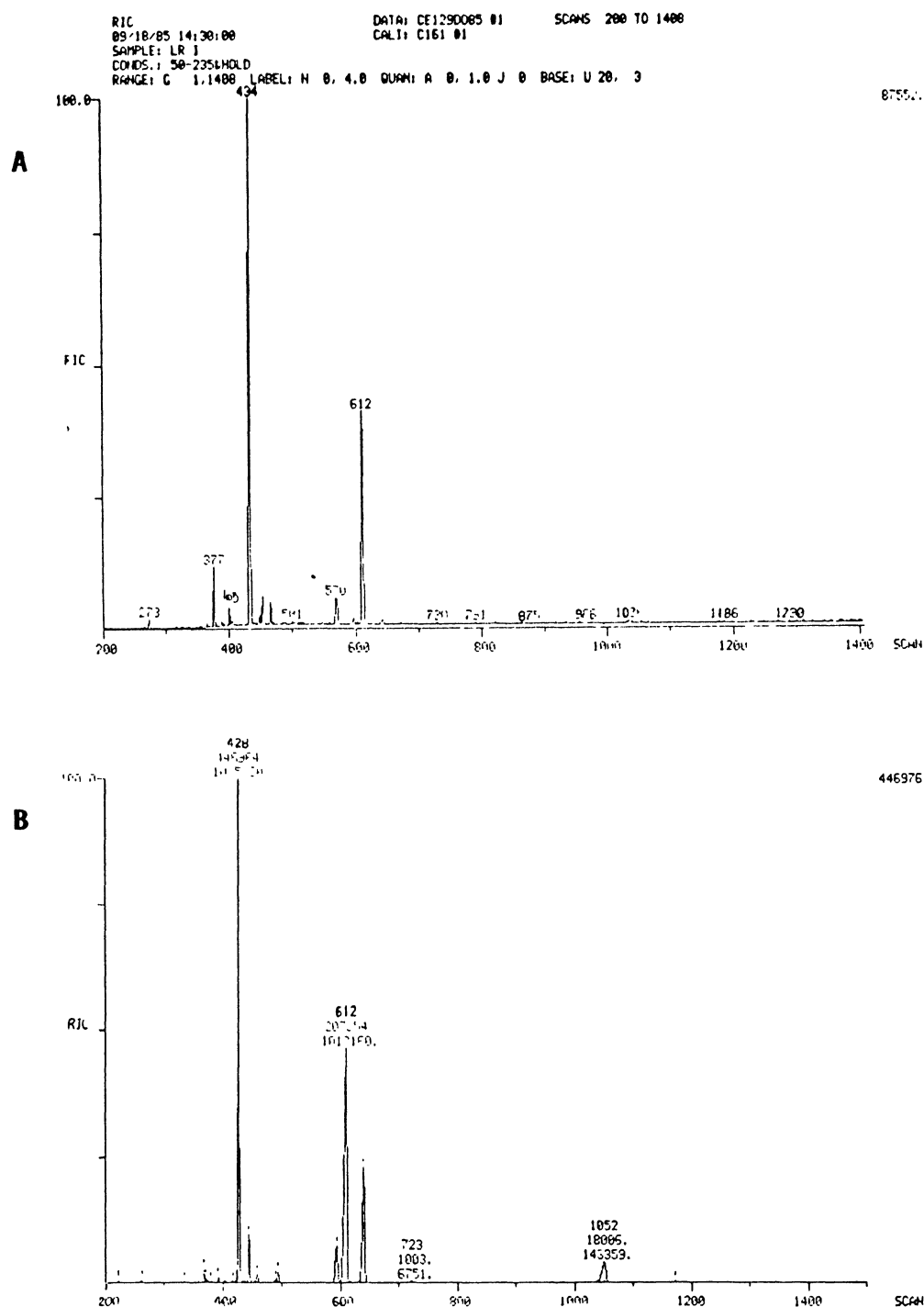


Fig. 8 - ANÁLISE POR c.f.g.-e.m. (COLUNA CAPILAR DB-210, 50-2350, 400/MINUTO) DOS PRODUTOS DE HIDRÓLISE ÁCIDA DA FRAÇÃO OP-I, NA FORMA DE ACETATOS DE ALDITÓIS.

A- hidrolisado com ácido trifluoroacético 1M por 12 h a 100°

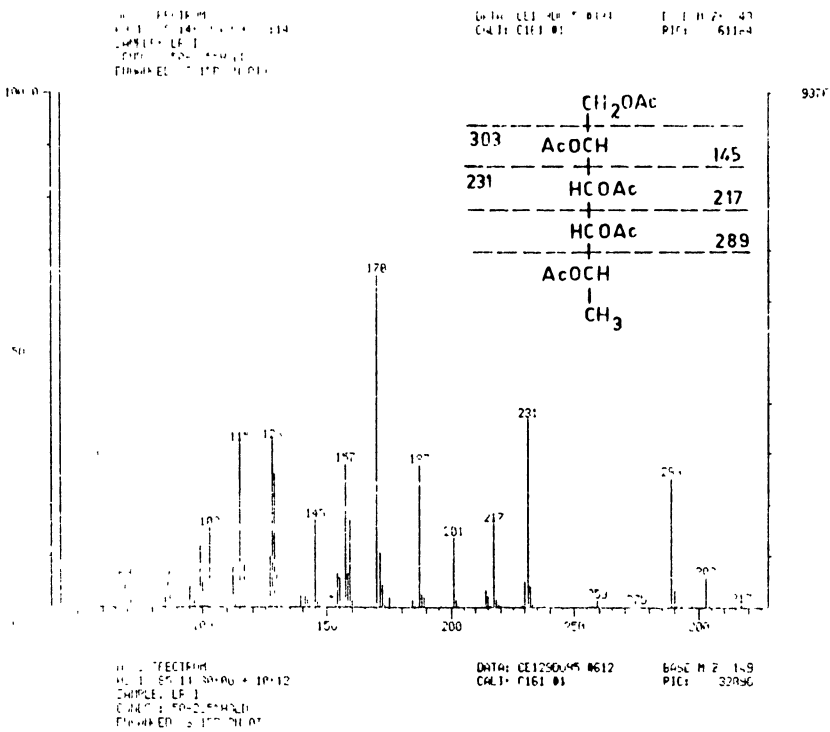
B- hidrolisado com ácido trifluoroacético 5M por 12 h a 100°

428-434 - fucitol penta-O-acetato (penta-O-Ac-Fuc)

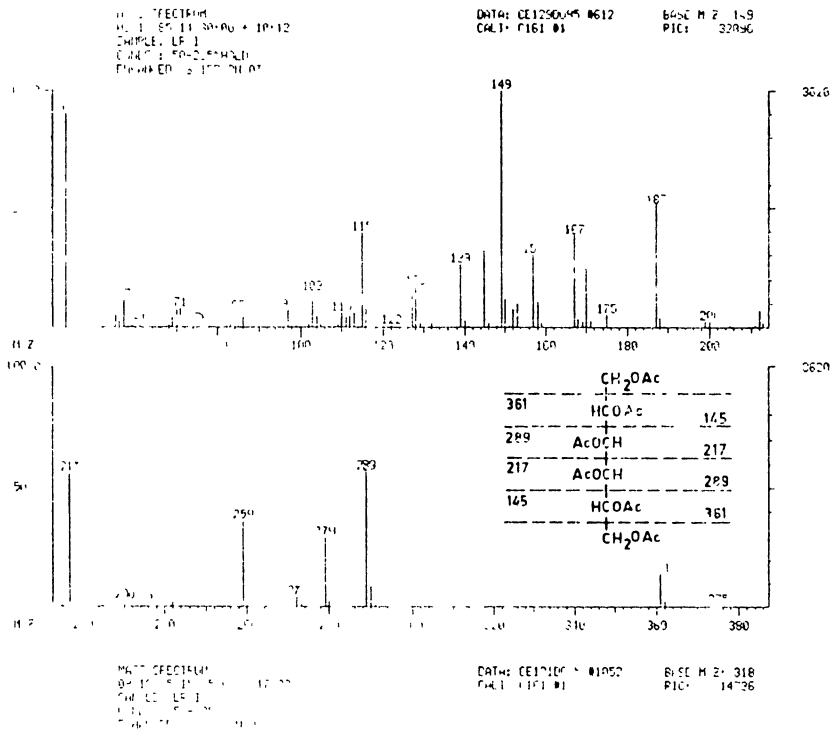
612 - galactitol hexa-O-acetato (hexa-O-Ac-Gal)

1052 - 2-deoxi-2-acetamido-hexitol penta-O-acetato (penta-O-Ac-HexNAc)

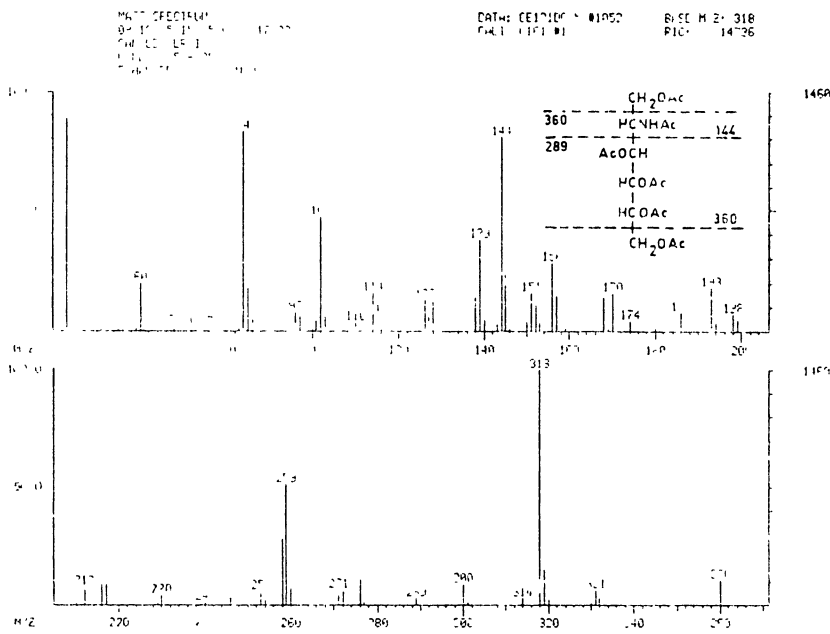
penta-C-Ac-Fuc
(I)



hexa-O-Ac-Gal
(II)



penta-O-Ac-HexNAc
(III)



A análise por espectrometria de massa (c.f.g.-e.m., coluna capilar DB-210, 50 \times 2350, 400/minuto) dos produtos de hidrólise ácida da fração OP-I confirmou, mais uma vez, a presença de hexosamina na forma do derivado per-*O*-acetilado (m/e 144, 289, 360)¹⁰⁷, III. Entretanto, nestas condições, a separação entre *N*-acetil-glucosaminitol e *N*-acetil-manosaminitol per-*O*-acetilados não foi possível (Fig.8-B). Estes dados não permitiram concluir se o polímero continha originalmente o grupo *N*-acetil.

A ocorrência do grupo *N*-acetil nas frações OP-I e OP-pH7 foi somente evidenciada por r.m.n.-¹³C. Realmente o sinal em δ 23,8, presente em ambos os espectros, é indicativo de CH₃ do grupo *N*-acetil. Este dado, juntamente com os sinais de δ 54,8 (CH-NH, C-2) e δ 97,4 (C-1) (Fig's. 9 e 17), é consistente com a presença do componente *N*-acetil- α -hexosamina nestas frações^{61,63,103}, conforme será discutido posteriormente. A constatação de que estas unidades encontram-se totalmente na forma *N*-acetilada, foi obtida pela equivalência entre as áreas (peso em mg) dos picos de C-2 e do carbono metílico do grupo *N*-acetil.

A espectroscopia de r.m.n.-¹H da fração OP-pH 7 também confirmou a presença de CH₃ do grupo *N*-acetil, através do sinal de δ 2,5 (Fig. 10), em concordância com os dados obtidos por GORIN *et al.*⁶⁵ em (2-acetamido-2-deoxi-gluco)mananas de leveduras.

A ausência de grupos *O*-acetil e de acetal de ácido pirúvico nas frações OP-pH 7 e OP-I foi comprovada, respectivamente, por métodos químico (na forma de complexo aceto-hidroxâmico)^{68,84} e enzimático (utilizando desidrogenase láctica de músculo de coelho)^{16,42}, o que assegura a atribuição dos sinais em δ 23,8 (r.m.n.-¹³C) e em δ 2,5 (r.m.n.-¹H) apenas ao CH₃ do grupo *N*-acetil.

Uma tentativa de identificação do tipo de hexosamina, presente no hidrolisado da fração OP-I, foi realizada pelo proces

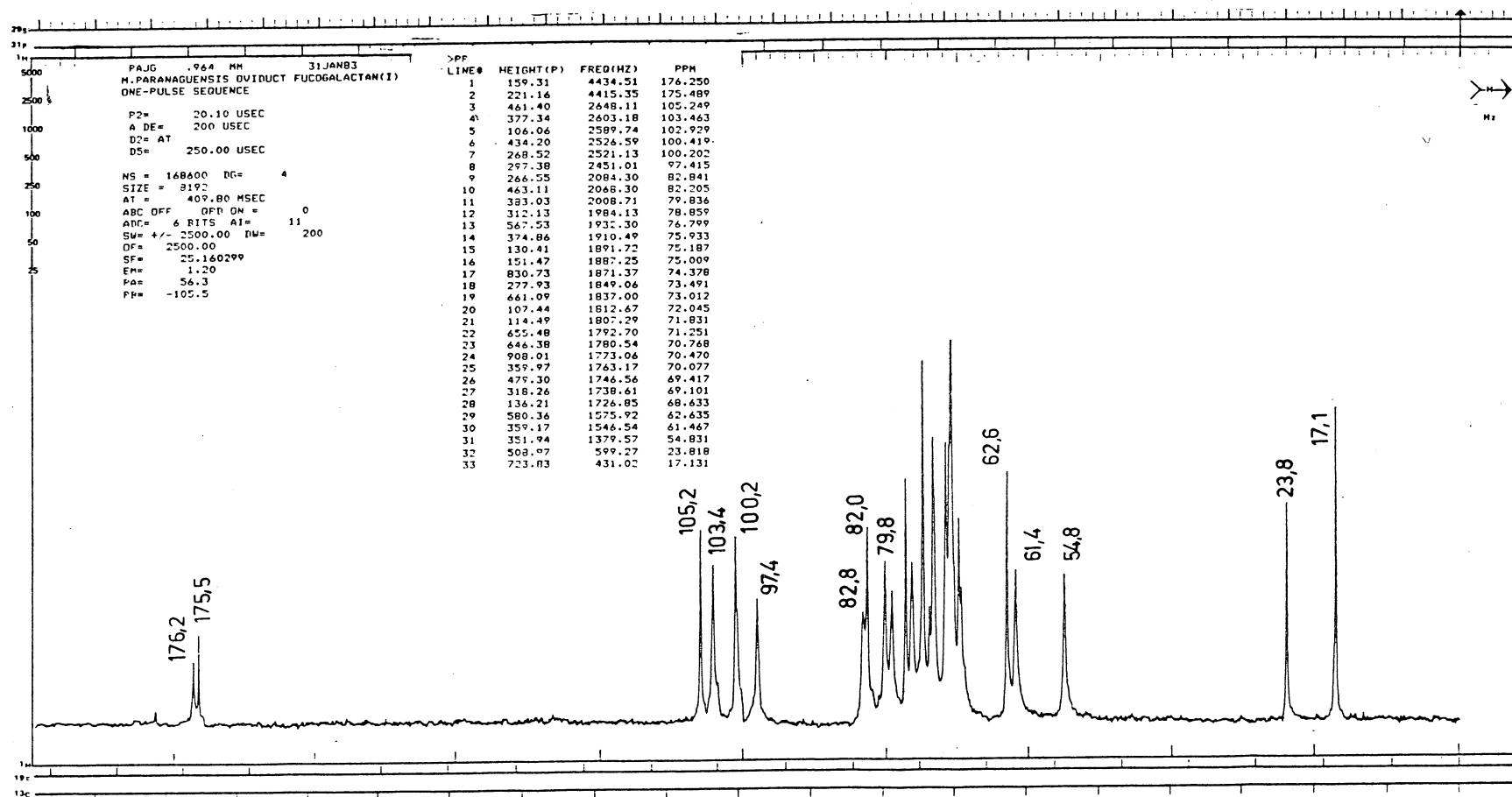


Fig. 9 - ESPECTRO DE r.m.n.- ^{13}C DA FRAÇÃO OP-pH 7, OBTIDO A 100 MHz EM RELAÇÃO AO NÚCLEO DE ^1H , NA TEMPERATURA DE 700, EM D_2O .

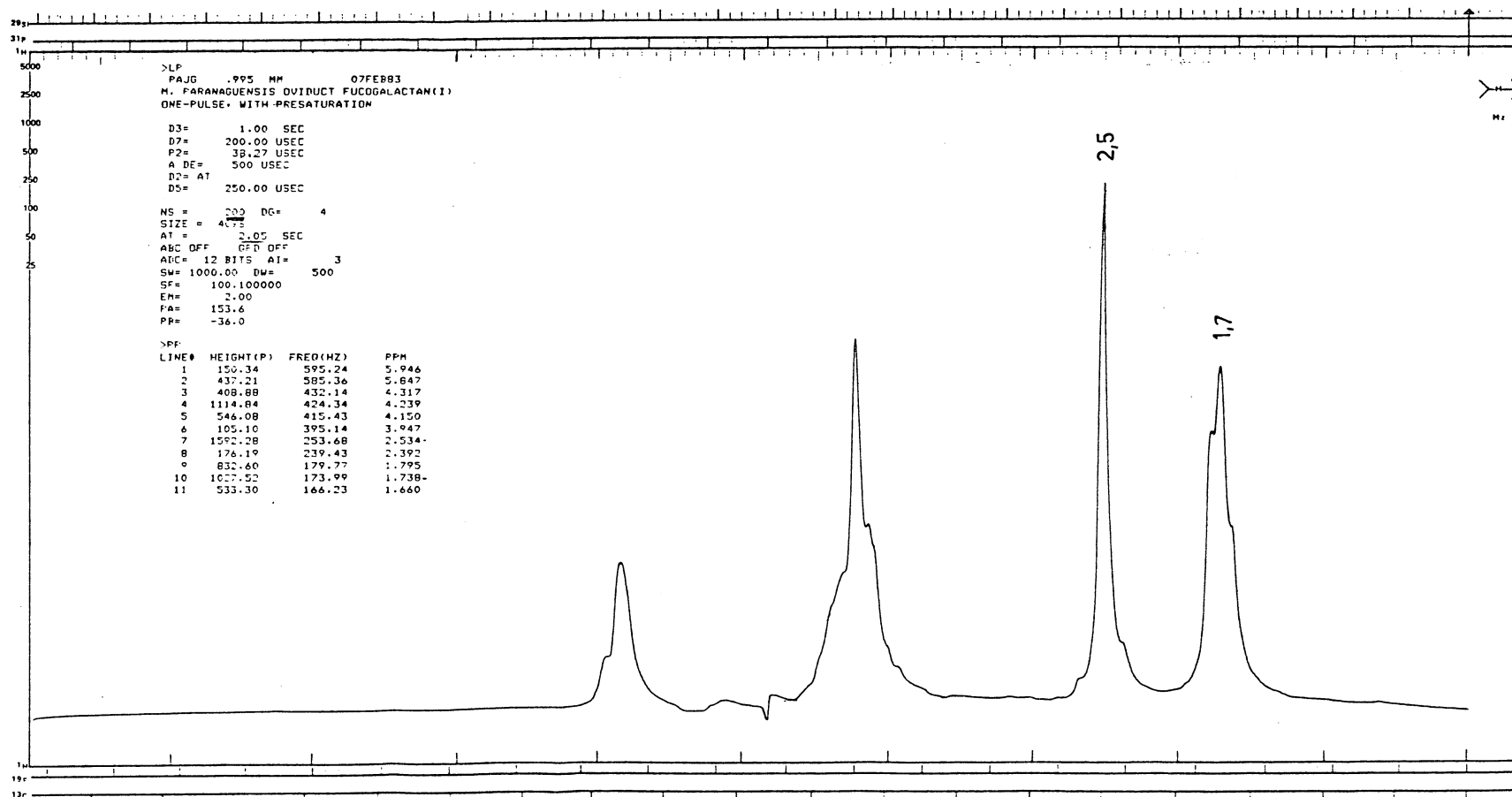


Fig. 10 - ESPECTRO DE r.m.n.- ^1H DA FRAÇÃO OP-pH 7, OBTIDO A 100 MHz EM RELAÇÃO AO NÚCLEO DE ^1H , COM A TÉCNICA DE PRÉ-SATURAÇÃO, NA TEMPERATURA DE 70°, EM D_2O .

so oxidativo com ninidrina, descrito por STOFFYN & JEANLOZ¹⁰⁸.

De acordo com este método, os açúcares aminados são degradados a pentoses pela oxidação com ninidrina, em meio contendo piridina como agente tamponante. Assim, a presença da galactosamina e glucosamina pode ser confirmada pela formação de l_{ix}ose e arabinose, respectivamente, entre os produtos da degradação. Esta técnica possui o inconveniente de não diferenciar açúcares aminados que sejam epímeros em C-2, pois estes serão convertidos a uma mesma pentose. Desta forma, glucosamina e manosamina são degradadas a arabinose, enquanto que galactosamina e talosamina geram l_{ix}ose.

No tratamento do hidrolisado da fração OP-I com ninidrina, a arabinose foi detectada por c.p. ascendente (fase móvel c, visualizador 1) como único produto de degradação, demonstrando que unidades de glucosamina e/ou manosamina constituem os açúcares aminados presentes nesta fração polissacarídica (Fig. 11).

A configuração das unidades de hexosamina da fração OP-I foi primeiramente evidenciada por c.p. descendente (fase móvel a, visualizadores 1 e 3), com migração de 90 horas. Este sistema cromatográfico permitiu uma separação apreciável dos cloretos de galactosamina (R_{Ga1} de 0,51), glucosamina (R_{Ga1} de 0,62) e manosamina (R_{Ga1} de 0,73), sendo que o composto aminado, presente no hidrolisado desta fração (ácido clorídrico 6M, por 8 h a 100°), apresentou um R_{Ga1} semelhante ao da glucosamina (Fig. 12).

A ocorrência de glucosamina na fração OP-I também foi comprovada por c.f.g. (coluna convencional OV-225, 227°). A a-

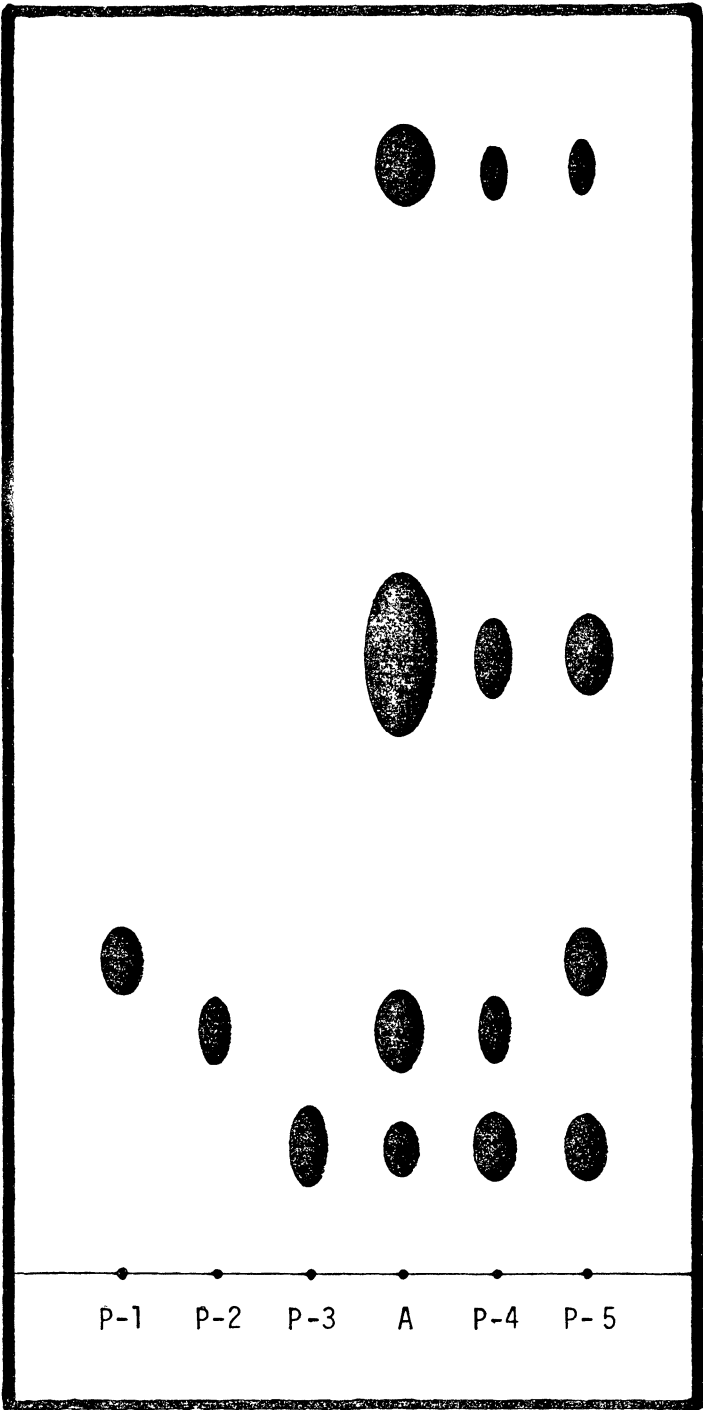


Fig. 11 - ANÁLISE POR c.p. ASCENDENTE (FASE MÓVEL a, VISUALIZA
DOR 1) DOS PRODUTOS DE OXIDAÇÃO COM NINIDRINA DA FRA
ÇÃO OP-I.

Padrões	P-1	lixose
	P-2	arabinose
	P-3	glucosamina
Padrões oxidados	P-4	glucosamina
	P-5	galactosamina
Amostra oxidada	A	hidrolisado (HCl 6M) da fração OP-I

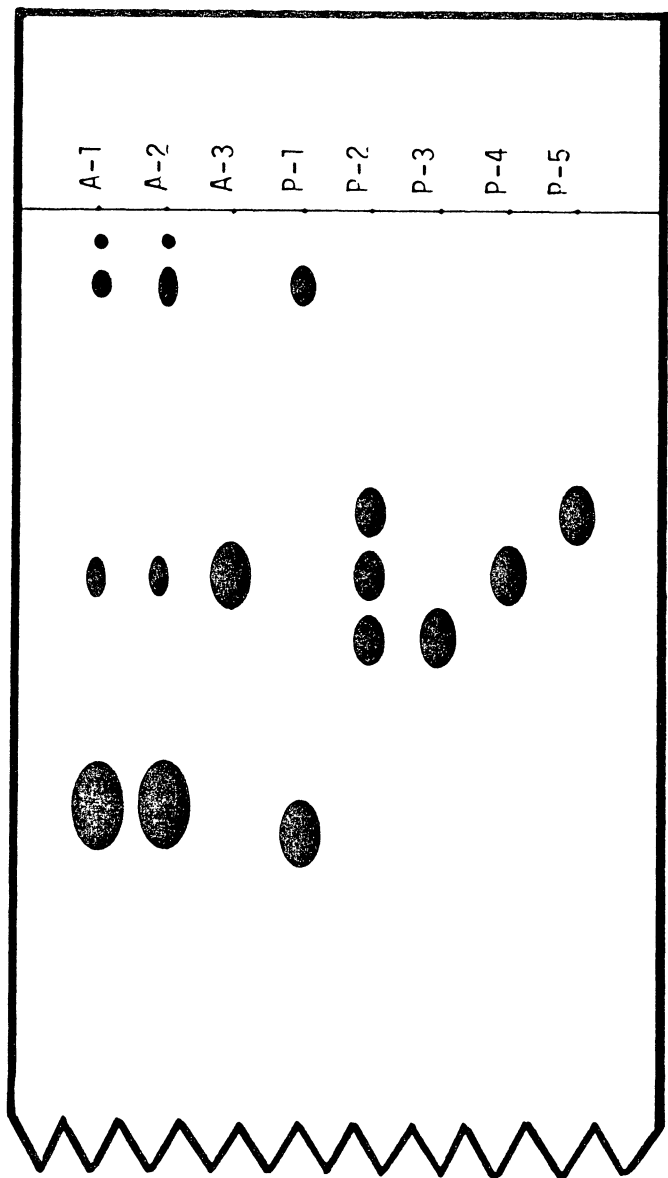


Fig. 12 - ANÁLISE POR c.p. DESCENDENTE (FASE MÓVEL c, VISUALIZADOR 1) DOS PRODUTOS DE HIDRÓLISE ÁCIDA DA FRAÇÃO OP-I.

Tempo de corrida: 90 horas.

Padrões	P-1	ácido glucurônico e galactose
	P-2	análise simultânea dos padrões P-3, P-4 e P-5
	P-3	cloridrato de manosamina
	P-4	cloridrato de glucosamina
	P-5	cloridrato de galactosamina
Amostras	A-1	hidrolisado com ácido trifluoroacético 6M por 12 h a 100°
	A-2	hidrolisado com ácido trifluoroacético 4M por 12 h a 100°
	A-3	hidrolisado com ácido clorídrico 6M por 8 h a 100°

nálise cromatográfica de seus produtos de hidrólise ácida (ácido trifluoroacético 5M, por 12 horas a 100°), na forma de acetatos de alditóis, indicou a presença de um componente com T de 8,8 (Fig. 13). Nas mesmas condições, uma co-injeção de padrões sintéticos de *N*-acetil-hexosaminitóis per-*O*-acetilados demonstrou que o *N*-acetil-glucosaminitol apresentou o mesmo T do componente aminado da fração OP-I, enquanto que *N*-acetil-galactosaminitol e *N*-acetil-manosaminitol não puderam ser diferenciados entre si, mas apresentaram um mesmo T (10,1), bastante distinto do *N*-acetil-glucosaminitol (Fig. 14).

Portanto, estes dados, combinados com os de espectroscopia de ressonância de ^{13}C e ^1H , são consistentes com a presença de *N*-acetil-glucosamina nestas frações.

O caráter ácido da fração polissacarídica de oviduto-próstata de *M. paranaguensis* foi primeiramente evidenciado no polímero bruto, através da precipitação com base quaternária em pH 7 e pelo seu equivalente de neutralização (700 por 100 gramas de peso seco).

Após purificação em coluna de DEAE-celulose a fração majoritária OP-I, eluída da coluna com cloreto de potássio 0,25M, demonstrou um equivalente de neutralização próximo ao valor da fração original (590 por 100 gramas de peso seco). Em ambos os resultados, o caráter ácido observado não foi compatível com o teor em grupo sulfato, presente nos polímeros OP-pH 7 e OP-I numa pequena proporção (3,4% e 0,8%, respectivamente). Tal fato sugeriu a existência de uma nova unidade ácida na estrutura do polímero.

A análise do polímero original e da fração OP-I pela téc

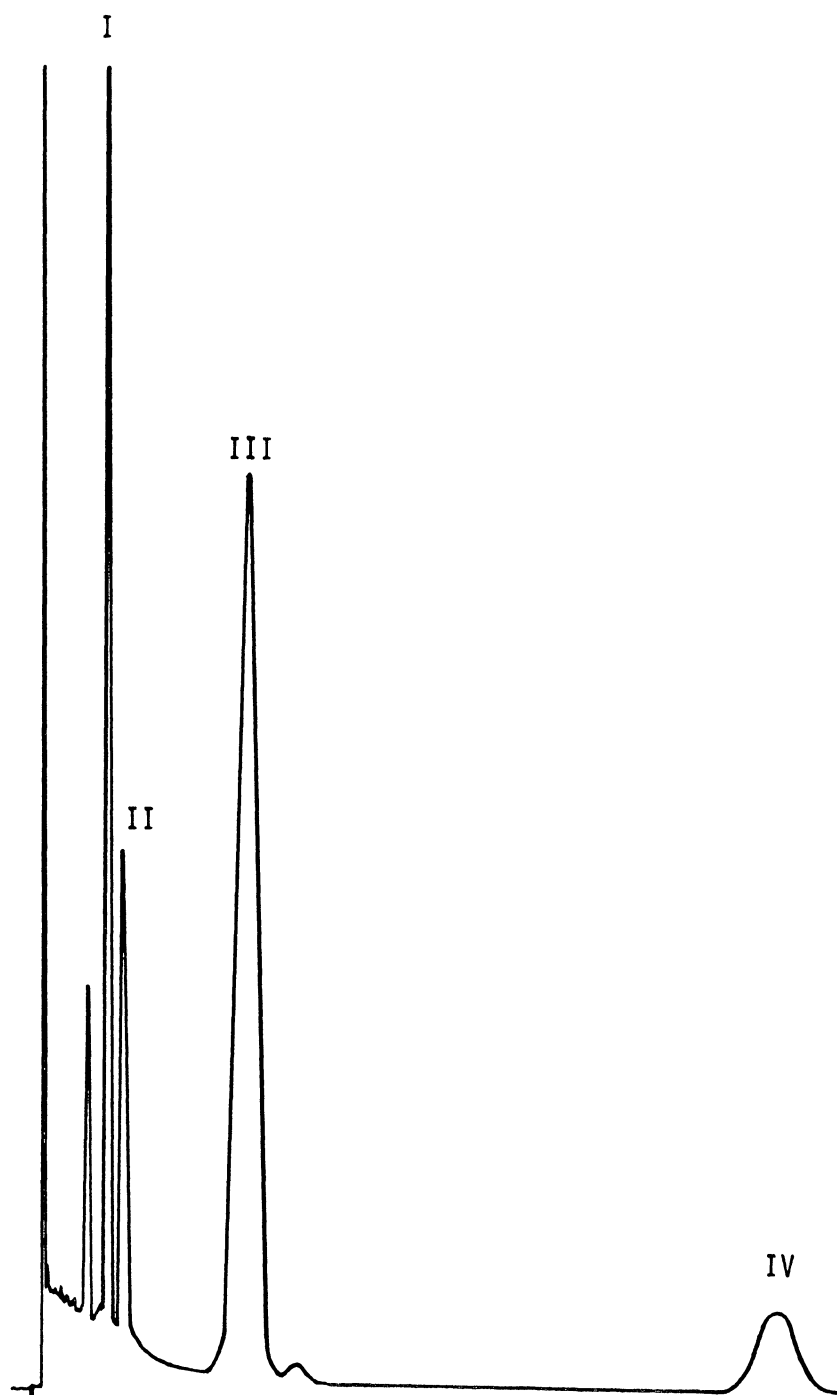


Fig. 13 - ANÁLISE DOS PRODUTOS DE HIDRÓLISE ÁCIDA (TFA 5M POR 12 h A 100°) DA FRAÇÃO OP-I POR c.f.g. (COLUNA OV-225 A 3% EM CHROM Q, 227°), NA FORMA DE ACETATOS DE ALDITÓIS

- I - fucitol penta-*O*-acetato
- II - arabinitol penta-*O*-acetato (padrão interno)
- III - galactitol hexa-*O*-acetato
- IV - 2-deoxi-2-acetamido-glucitol penta-*O*-acetato

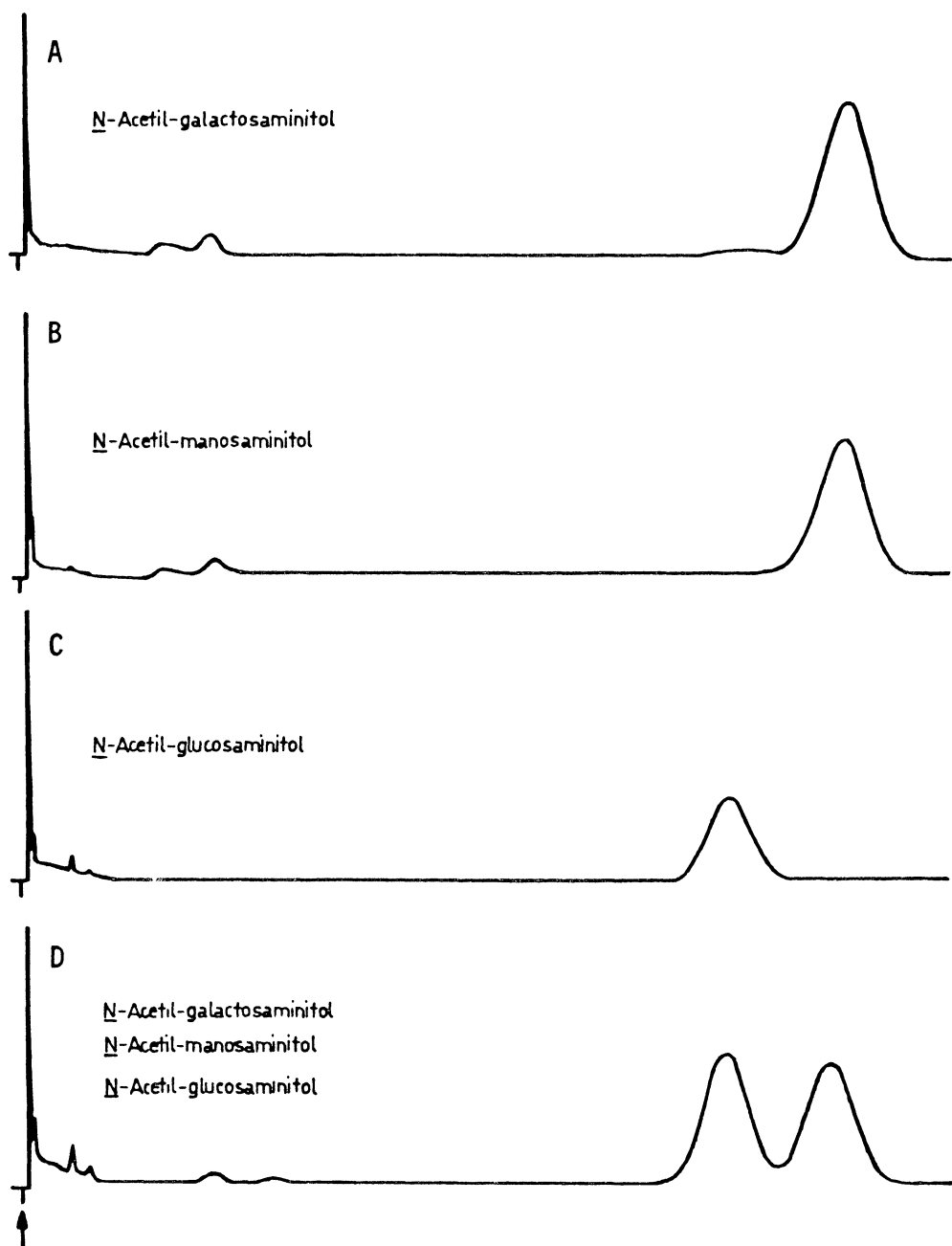


Fig. 14 - ANÁLISE POR c.f.g. (COLUNA CONVENCIONAL OV-225 A 3% EM CHROM. Q, 2279) DE *N*-ACETIL-HEXOSAMINITÓIS PER-*O*-ACETILADOS

A, B e C - padrões injetados isoladamente

D - padrões injetados simultaneamente (co-injeção).

nica do carbazol³² sugeriu a presença de ácido urônico nestes polímeros.

Realmente, as unidades de ácido urônico foram observadas, qualitativamente, no hidrolisado da fração OP-I, por técnicas eletroforéticas e cromatográficas.

A análise cromatográfica do hidrolisado da fração OP-I por c.p. ascendente (fase móvel **b**, visualizadores **1**, **2** e **4**), demonstrou a presença de um componente com R_{Ga1} de 0,14, compatível com a migração de ácido urônico. A visualização do cromatograma com azul de bromofenol³⁰ também indicou para este composto um comportamento semelhante ao de um ácido urônico (Fig. 15).

Vários processos de hidrólise da fração OP-I foram testados, tais como concentrações de 0,5M de ácido sulfúrico e de 1M e 4M de ácido trifluoroacético, por 12-18 horas a 100°, visando o melhor rendimento em ácido urônico. A condição de hidrólise ácida que apresentou o melhor rendimento foi aquela utilizando ácido sulfúrico, conforme demonstra a Figura 15.

A investigação da presença de ácido urônico, no hidrolisado com ácido sulfúrico da fração OP-I, foi também realizada por c.c.d. (fase móvel **d** e visualizador **2**), em placas de celulose (Merck). Deste modo, foi observada a presença de dois componentes, com migrações cromatográficas semelhantes às observadas para padrões simples de ácido glucurônico e glucuronolactona. Para o isolamento de tais componentes, foi realizada uma cromatografia preparativa nas mesmas condições.

Tais compostos foram então investigados por eletroforese de alta voltagem, utilizando tampão borato 10mM contendo cloreto de cálcio 5mM⁶⁶. Através deste sistema, foi possível uma



Fig. 15 - ANÁLISE POR c.p. ASCENDENTE (FASE MÓVEL **b**, VISUALIZADOR 4) DOS PRODUTOS DE HIDRÓLISE ÁCIDA DA FRAÇÃO OP-I.

Amostras	A-1 - hidrolisado com ácido trifluoroacético 1M por 12 h a 100°
	A-2 - hidrolisado com ácido trifluoroacético 4M por 12 h a 100°
	A-3 - hidrolisado com ácido sulfúrico 0,5M por 18 h a 100°
Padrões	P-1 - galactose e fucose
	P-2 - cloridrato de glucosamina
	P-3 - ácido glucurônico
	P-4 - ácido manurônico
	P-5 - ácido galacturônico

separação razoável entre padrões dos ácidos glucurônico ($M_{Gal} = 2,50$), galacturônico ($M_{Gal} = 1,95$) e manurônico ($M_{Gal} = 1,61$). Um componente, com comportamento semelhante ao de ácido glucurônico, foi observado no hidrolisado da fração OP-I. Provavelmente, em virtude do pH alcalino do meio (tampão eletroforético), não foi detectada a presença de lactonas (Fig. 16).

Os espectros de r.m.n.- ^{13}C das frações OP-pH 7 e OP-I, como demonstra a Tabela II, apresentam uma estreita semelhança no que concerne aos deslocamentos químicos observados.

O espectro de r.m.n.- ^{13}C da fração OP-I (Fig. 17), acusa a presença de dois sinais em campo baixo, em δ 175,5 e 176,6, provavelmente correspondentes aos carbonos carbonílicos das unidades de ácido urônico e dos grupos *N*-acetil, embora não seja possível esclarecer a qual estrutura atribuir estes sinais^{43,61,63}.

O espectro de r.m.n.- ^{13}C da fração OP-I (Fig. 17) também fornece, na região correspondente à ressonância de carbonos anoméricos (δ 95 a 105), a presença de quatro sinais distintos.

Nesta região, os sinais de C-1 em campo mais alto podem ser atribuídos a unidades com configuração alfa, enquanto que os sinais de C-1 em campo mais baixo são indicativos de configuração beta⁶¹.

Dentre os sinais de C-1 observados para a fração OP-I, dois (δ 97,2 e 100,2) estão em campo mais alto, sugerindo que as unidades que os geraram apresentam configuração alfa.

O sinal em δ 97,2 é típico de unidades de 2-amino(acetamido)-2-deoxi- α -gluco(galacto)piranosil^{61,103}. Como a configuração da hexosamina foi previamente estabelecida por outros méto-

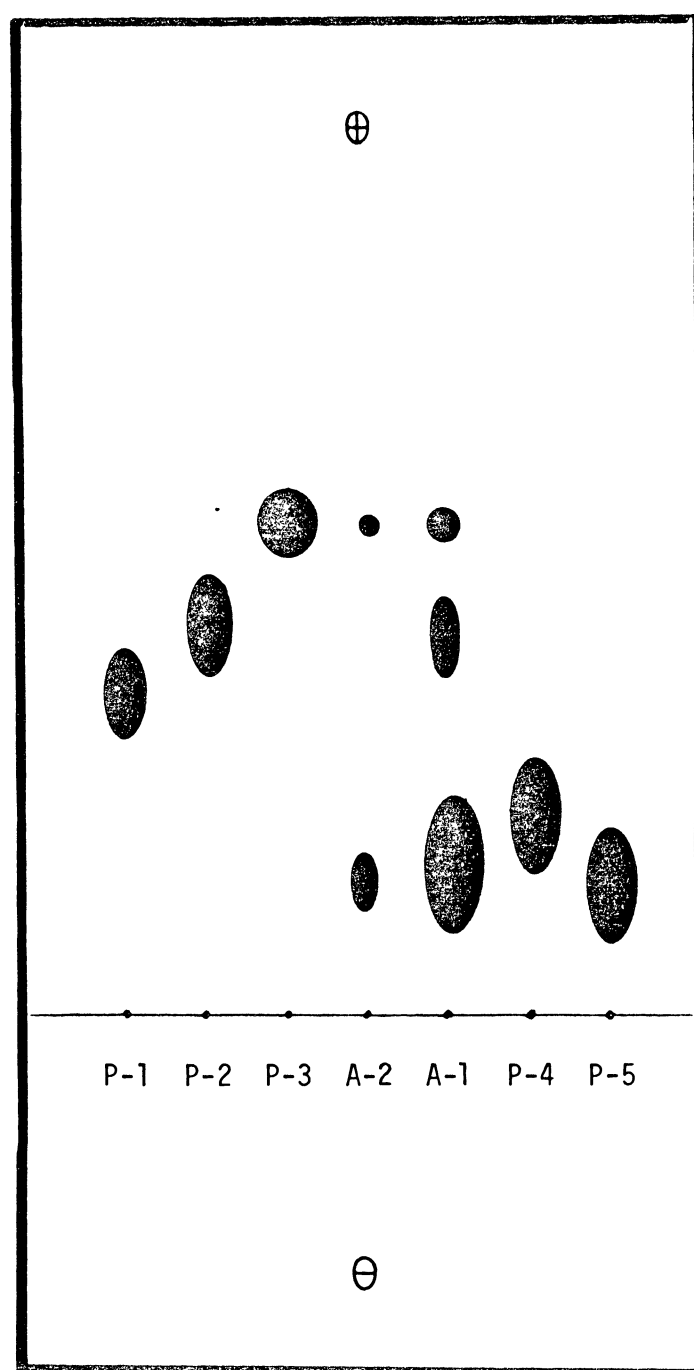


Fig. 16 - ELETROFORESE DE ALTA VOLTAGEM (1500V, 10 mA) DOS PRODUTOS DE HIDRÓLISE ÁCIDA DA FRAÇÃO OP-I

Tampão eletroforético: solução de CaCl_2 5 mM em tampão borato 10 mM.

Padrões
 P-1 ácido manurônico
 P-2 ácido galacturônico
 P-3 ácido glucurônico
 P-4 galactose
 P-5 fucose

Amostras
 A-1 hidrólise ácida (H_2SO_4 0,5M por 12 h a 100°)
 A-2 preparativa para ácidos urônicos obtida por c.c.d. (fase móvel **d**, visualizador 2) do hidrolisado A-I

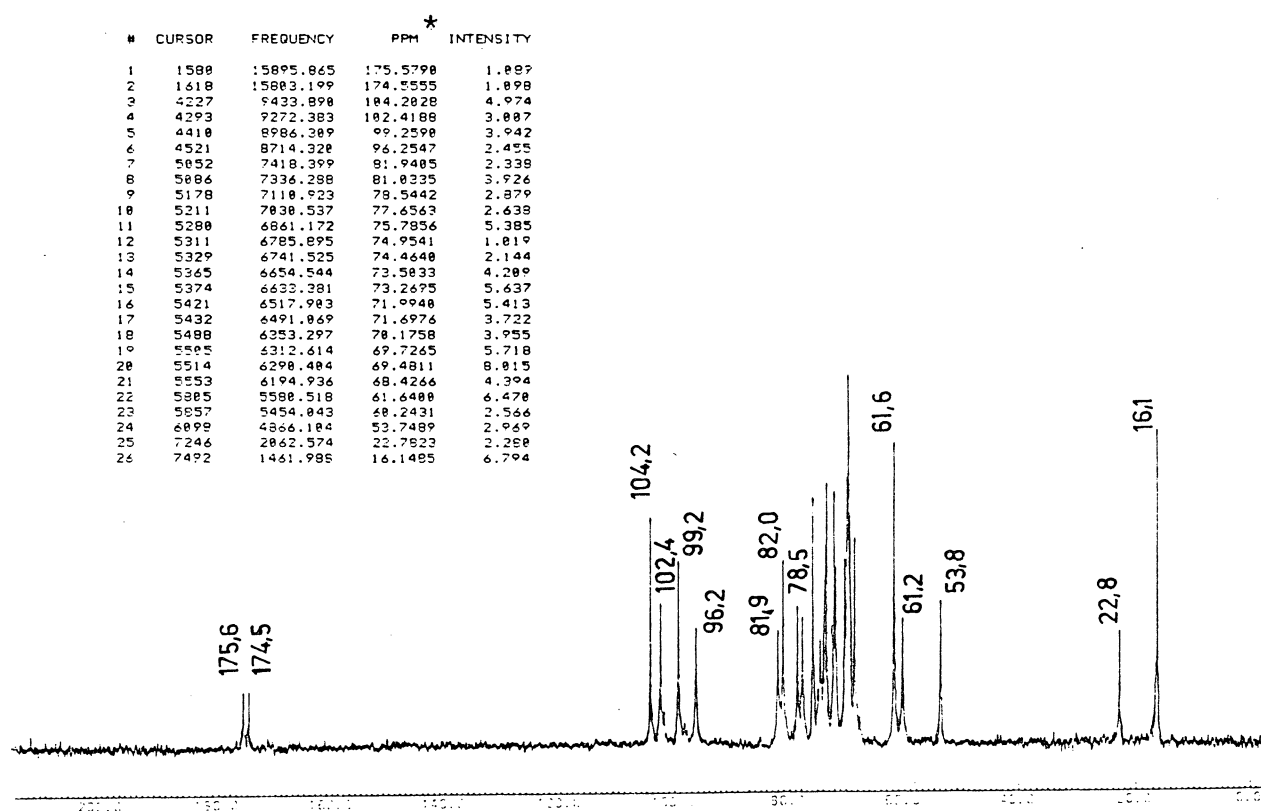


Fig. 17 - ESPECTRO DE r.m.n-¹³C DA FRAÇÃO OP-I, OBTIDO A 360 MHz EM RELAÇÃO AO NÚCLEO DE ¹H, NA TEMPERATURA DE 33º, EM D₂O.

* Os deslocamentos químicos obtidos a 33º C foram corrigidos para 70º pelo acréscimo de 1ppm (Tabela II).

TABELA II

DESLOCAMENTOS QUÍMICOS^a OBSERVADOS NA ANÁLISE POR r.m.n.-¹³C DAS FRAÇÕES OP-I e OP-pH 7.

NÚCLEOS	FRAÇÃO OP-pH 7 ^b				FRAÇÃO OP-I ^c			
	β -D-Gal	α -Fuc	α -GlcNAc	β -HexA	β -D-Gal	α -Fuc	α -GlcNAc	β -HexA
C - 1	105,2	100,2	97,4	103,4	105,2	100,2	97,2	103,4
C - 2	-	-	54,8	-	-	-	54,8	-
C - 3*	-	-	-	82,8	-	-	-	82,9
C - 4*	-	82,2	79,8	-	-	82,0	79,5	-
C - 6	62,6	17,1	61,4	175,5	62,6	17,1	61,2	175,5
CH ₃ -CO	-	-	176,2	-	-	-	176,5	-
CH ₃ -CO	-	-	23,8	-	-	-	23,8	-

^a Deslocamentos químicos expressos em δ (ppm), relativamente ao TMS;^b Espectro obtido em Espectrômetro Varian XL-100-15, a 100 MHz em relação ao núcleo de ¹H, na temperatura de 70°.^c Espectro obtido em Espectrômetro Bruker AM-360 WB, a 360 MHz em relação ao núcleo de ¹H, na temperatura de 33°. Para que pudessem ser comparados com os primeiros, os deslocamentos químicos obtidos a 33° foram corrigidos para 70° pelo acréscimo de 1 ppm.

* Deslocamentos químicos caracteristicamente atribuídos às unidades substituídas nas posições correspondentes.

dos, este sinal pode ser atribuído ao C-1 das unidades de *N*-acetil- α -glucosamina, presentes no polímero em estudo.

As unidades de fucopirranose, em polissacarídeos de ocorrência natural, geralmente apresentam configuração α -L. Desta forma, sinal de C-1 (δ 100,2) do polímero OP-I deve ser atribuído à fucopirranose na configuração alfa. Entretanto, não se pode assegurar, com base nestes dados, que estas unidades correspondam ao enantiômero L, dado que a ocorrência de seu enantiômero já foi observada em polissacarídeos. Futuramente, isto poderá ser comprovado pela identificação (c.f.g.) do derivado quiral (-)-2-octil-fucosídeo, de acordo com o processo de LEONTEIN *et al.*⁷⁶.

Os sinais de C-1 em campo mais baixo (δ 103,4 e 105,2), presentes no espectro de r.m.n.-¹³C da fração OP-I, foram atribuídos às unidades com configuração beta^{43,63}, ou seja, galactose e ácido urônico. Entretanto, não se pode afirmar a qual unidade corresponde cada um destes sinais (Tabela II).

Para efeito de quantificação das áreas presentes nos espectros de r.m.n.-¹³C realizados, o sinal de δ 105,2 foi atribuído às unidades de galactose, enquanto que o sinal de δ 103,4 foi relacionado ao ácido urônico.

Ainda que hajam evidências cromatográficas e eletroforéticas para supor que o composto ácido da fração OP-I corresponda ao ácido glucurônico, um estudo mais detalhado deverá ser realizado neste sentido, envolvendo redução (derivado de carbodiimida) e degradação (alcalina) específicas neste polímero.

6. COMPOSIÇÃO QUÍMICA QUANTITATIVA DA FRAÇÃO OP-I

A composição química quantitativa da fração OP-I, expressa em termos de seu peso seco, está representada da Tabela III. Foi detectada no polímero, por método químico, uma pequena percentagem de proteína (0,8%), embora a ressonância magnética de ^{13}C não tenha demonstrado nenhum sinal que acusasse a presença de proteína neste polímero.

Foi também observado que o teor de sulfato (3,4%), presente no polímero original, reduziu-se a apenas 0,8% na fração purificada por coluna de DEAE-celulose (fração OP-I). Nenhuma investigação foi realizada sobre a localização deste grupo ácido, na estrutura do polímero.

A composição química percentual da fração OP-I foi de difícil estabelecimento, em virtude da interferência de seus componentes sobre os diferentes processos analíticos. Com a finalidade de minimizar tais interferências, vários fatores de correção foram estabelecidos.

Para a determinação do teor em açúcares neutros, foi selecionado o método do fenol-ácido sulfúrico, por não formar furfural com hexosaminas e corresponder apenas a 42% do valor total de ácido urônico presente na amostra.

Assim, a percentagem de açúcar neutro da fração OP-I, apresentado na Tabela III, foi determinado pela relação

$$AN = AT + A - B$$

sendo,

$$A = 0,42 \times \%_{Fuc} \quad \text{e} \quad B = 0,42 \times \%_{AU}$$

TABELA III

COMPOSIÇÃO QUÍMICA DA FRAÇÃO POLISSACARÍDICA OP-I.

Determinações		% ^b
Açúcares Neutros ^c	Fucose ^d	23,3
	Galactose ^d	23,3
Hexosamina ^e		21,6
Ácido Urônico ^f		18,4
Grupo <i>N</i> -acetil ^g		7,2 (10,0)
Grupo Sulfato ^h		0,8
Proteína		0,8

a Na determinação da composição química da fração OP-I, fatores de correção apropriados foram utilizados;

b Valores percentuais expressos em termos de peso seco da fração;

c Dosado pelo método do fenol-ácido sulfúrico³⁹, excluindo a percentagem de ácido urônico;

d Relação molar 1:1, estabelecida pela análise por c.f.g.(coluna convencional OV-225, 1900), dos produtos de hidrólise ácida (H₂SO₄ 0,5M, por 12 horas a 1000), na forma de alditóis acetilados;

e Dosado pelo método de ELSON-MORGAN, modificado por BOAS²⁰;

f Dosado pelo método do carbazol, segundo DISCHE³², excluindo a interferência dos açúcares neutros;

g Valor teórico ao teor em hexosamina que, de acordo com a análise por r.m.n. de ¹³C da fração OP-I, encontra-se totalmente na forma *N*-acetilada. O valor entre parêntesis, foi determinado experimentalmente pelo processo de LUDOWIEG & DORFMAN⁸²;

h Dosado pelo método da benzidina, segundo ANTONOPOULOS⁶;

i Determinada pelo reagente fenólico de Folin-Ciocalteu, segundo LOWRY *et al.*⁸¹

onde,

- AN = açúcar neutro, em termos percentuais de peso seco da fração;
- AT = açúcar total, determinado pelo método do fenol-ácido sulfúrico³⁹ e expresso em termos percentuais de peso seco da fração;
- A = termo de correção para a fucose, devido a menor sensibilidade do método a estas unidades;
- B = termo de correção para o ácido urônico, a fim de eliminar a interferência destas unidades;
- %_{Fuc} = percentual de fucose na fração, calculado do teor de AT (corrigido para % AU), com base na relação molar de 1:1 (c.f.g.) de seus açúcares neutros, ou seja: $\%_{Fuc} = \frac{1}{2} (AT - B)$;
- %_{AU} = percentual de ácido urônico na fração, dosado pelo método do carbazol descrito por DISCHE³² e expresso em termos percentuais do peso seco da fração (fatores de correção foram considerados).

Os resultados, obtidos nas dosagens de açúcar neutro na fração OP-I, foram expressos em termos de um padrão de galactose. Foi comprovado experimentalmente que o fator de resposta do método do fenol-ácido sulfúrico³⁹ à 6-deoxi-galactose reduz-se a 58%, quando comparada com a galactose. Desta forma, foi estabelecido um termo de correção ($A = (1 - 0,58) \times \%_{Fuc}$), proporcional ao teor em unidades de fucose presente na fração, para reparar a menor sensibilidade do método a estas unidades.

Um segundo termo de correção ($B = 0,42 \times \%_{AU}$) foi estabelecido, a fim de eliminar a interferência (42%) causada pelas unidades de ácido urônico, sobre a percentagem de açúcar total (AT) obtida experimentalmente pelo método citado. Desse modo, a percentagem de açúcares neutros, apresentada na Tabela III, corresponde a um valor teórico obtido após a correção

do açúcar total pelos fatores apropriados.

A fórmula para o cálculo do açúcar neutro da fração OP-I foi aplicada como segue:

$$AN = AT + (0,42 \times \%_{Fuc}) - (0,42 \times \%_{AU})$$

onde,

$$AT = 46,1 \text{ g/100 g de peso seco de polissacarídeo;}$$

$$\%_{Fuc} = 19,2 \text{ g/100 g de peso seco de polissacarídeo;}$$

$$\%_{AU} = 18,4 \text{ g/100 g de peso seco de polissacarídeo.}$$

Assim;

$$AN = 46,1 + (0,42 \times 19,2) - (0,42 \times 18,4)$$

$$AN = 46,1 + 8,1 - 7,7$$

$$AN = 46,5\% \text{ ou}$$

$$46,5 \text{ g/100 g de peso seco de polissacarídeo.}$$

A relação molar entre as unidades de fucose e galactose (1:1) nos produtos de hidrólise ácida da fração OP-I, foi obtida por c.f.g. (coluna convencional OV-225, 190°) segundo o processo de triangulação de áreas, descrito por SAWARDEKER *et al.*⁹⁸.

Com base nesta relação molar, as percentagens de fucose e galactose da fração OP-I, quando relacionadas ao teor de açúcares neutros expressos em termos de seu peso seco (46, %), foram calculadas como sendo de 23,3 moles%, respectivamente (Tabela III).

A relação molar entre galactose e fucose, obtida para o polímero OP-I, é distinta daquela observada em polímeros isolados de outros órgãos de moluscos.

Foi comprovado que os polímeros isolados de glândula de

albúmen de moluscos do gênero *Biomphalaria* (*B. straminea*, *B. tenagophila* e *B. glabrata*)⁷⁰ e de *M. paranaguensis*¹⁰⁰ são desprovidos de unidades de fucose.

Entretanto, polissacarídeos contendo unidades de fucose e galactose foram assinalados em moluscos de várias espécies. FEIJÓ *et al.* detectaram L-fucopirranose (2%) na fucogalactana isolada de massa de ovas de *Ampullarius* sp. (Morretes, PR.)⁴⁸. Em glândula de albúmen de *Marisa cornuarietis* (Pantanal, MS), foi isolado um heteropolissacarídeo contendo 7% destas unidades³⁴. Um teor semelhante (10%) de fucose foi determinado no polímero isolado de *Marisa* sp. investigado por BRETTING *et al.*²¹

A quantificação do teor em hexosamina da fração OP-I, segundo o método ELSON-MORGAN modificado por BOAS²⁰, foi realizada nos produtos de hidrólise ácida da fração, utilizando ácido clorídrico 6M, por 8 horas a 100°. Uma amostra de cloridrato de glucosamina, submetida às mesmas condições de hidrólise, foi recuperada na percentagem de 68%, quando testada pelo método de BOAS²⁰. Desta forma, um fator de correção ($f = 1,47$) foi introduzido na determinação quantitativa das unidades de hexosamina.

Nas condições descritas, 21,6% de hexosamina (expresso em peso seco, Tabela III) foi obtida para o polímero OP-I. Outras condições de hidrólise, com diferentes concentrações de ácido trifluoroacético (1M, 2M, 5M) e de ácido sulfúrico (0,5M, e 1M) a 100° durante 8-12 horas, não apresentaram um rendimento satisfatório, de acordo com os resultados de c.p. ascendente (fase móvel a, visualizadores 1 e 3) (Fig. 6).

GARDELL^{57, 58}, investigando o conteúdo em amino-açúcares de

um polissacarídeo isolado de córnea, demonstrou que o tratamento do polímero com ácido clorídrico 6M, por 8 horas a 100°, forneceu um rendimento de 95% destas unidades. Quando o tempo de hidrólise ácida foi aumentado, o rendimento em amino-açúcares foi comprometido.

Realmente, as condições de hidrólise ácida parecem ser o fator limitante na quantificação de hexosaminas em macromoléculas. Por isso, diferentes condições de hidrólise com ácido clorídrico foram estabelecidas, em macromoléculas de várias origens, para otimizar o rendimento dessas unidades, tais como: concentrações de 6M por 16 horas a 100° para substâncias específicas dos grupos sanguíneos humanos (glicoproteínas)³; 6M por 18 horas a 90° em parede celular de *Neurospora crassa*⁹⁹; 4M por 4 horas a 100° para o componente polissacarídico de *Shigella dysenteriae* tipo 6³³ e 3M por 12 horas a 100° para o polissacarídeo específico de *Vibrio cholera*¹⁰¹.

Entretanto, condições de hidrólise ácida mais suaves (ácido clorídrico 2M por 14 horas a 100°) foram estabelecidas por BLIX¹⁹ para a liberação completa de hexosaminas, a partir de glicoproteínas de origem animal e alguns tipos de glicosaminoglicanas. Porém, um pequeno decréscimo da concentração de glucosamina, testada nestas condições, foi observado após períodos de aquecimento superiores a 24 horas.

Isto demonstra que as condições de hidrólise ótimas, para a liberação das unidades de hexosaminas, devem ser investigadas para cada tipo de macromolécula. Entretanto, qualquer que seja a condição de hidrólise selecionada, um fator de correção deve ser estabelecido para compensar a destruição destas unida

des, ocorrida durante o processo hidrolítico.

As unidades de açúcares aminos na natureza ocorrem, mais particularmente, no reino animal, onde aparecem como constituintes de um grande grupo de substâncias, os mucopolissacarídeos ou glicosaminoglicanas, cujas funções biológicas são tão importantes quanto diversificadas.

Neste grupo, encontram-se macromoléculas tais como a heparina (fator anticoagulante do sangue), as substâncias específicas dos grupos sanguíneos (determinantes antigênicos), ácido hialurônico, polissacarídeos de bactérias e outros microrganismos e polissacarídeos do tecido conectivo e outros componentes teciduais⁵⁴. A ocorrência de hexosaminas foi também constatada como componentes do exoesqueleto de crustáceos e do esqueleto de vertebrados, formando estruturas resistentes e de alta estabilidade química⁵⁷.

A importância biológica destas unidades podem ser ilustrada pela função que exercem em certas glicoproteínas. Por exemplo, as glicoproteínas anticongelante, isoladas de soro de peixes da Antártica, têm a propriedade de inibir a transição de fase da água ao gelo, protegendo o peixe de uma provável morte por congelamento. Estas glicoproteínas possuem uma estrutura tripeptídica repetitiva (Ala-Ala-Thr), à qual o dissacarídeo 3-O-β-D-galactopiranosil-N-acetil-galactosamina é ligado. Esta cadeia lateral dissacarídica é essencial para a atividade da glicoproteína e sua modificação (e.g., oxidação pelo periodato de sódio) destrói a propriedade anticongelante¹⁰².

A presença de unidades de hexosamina foi detectada, em certas espécies de moluscos, como constituinte de alguns tipos

de glicosaminoglicanas. Desta forma, DIETRICH *et al.*³¹ demonstraram a presença de heparina no molusco *Anomalocardia brasiliensis* e posteriormente, PAIVA *et al.*⁹² identificaram este polissacarídeo nas espécies *Donna striatus* e *Tivela mactroides*. Já a ocorrência de polissacarídeos acídicos e glicosaminoglicanas sulfatadas foi assinalada por NADER *et al.*⁸⁷, durante o desenvolvimento embrionário do molusco *Pomacea* sp., enquanto que FERREIRA *et al.*⁵⁰ evidenciaram a presença de heparan sulfato em cinco espécies de moluscos.

Entretanto, um polissacarídeo sulfatado contendo unidades de hexosamina, ácido urônico, fucose e galactose, numa relação aproximadamente equimolecular, como observado na fração polissacarídica do oviduto-próstata de *M. paranaguensis*, não havia ainda sido descrito em moluscos, bem como em nenhuma outra espécie animal.

Uma tentativa de quantificação dos grupos *N*-acetil foi realizada nos produtos de metanólise da fração OP-I, sob a forma de complexo aceto-hidroxâmico⁸², utilizando *N*-acetil-glucosamina como padrão. Nestas condições, 10% de grupos *N*-acetil foi observado nesta fração (Tabela III).

Considerando a ausência de grupos *O*-acetil^{68,84} e de acetal de ácido pirúvico^{16,40}, o teor de grupos *N*-acetil obtido experimentalmente mostrou-se superestimado (10%), quando comparado com o valor teórico calculado a partir do percentual de hexosamina da fração (7,2%). Portanto, o valor teórico (7,2%) foi utilizado na Tabela III como o valor mais representativo do teor em grupos *N*-acetil desta fração polissacarídica. Realmente o valor teórico do grupo *N*-acetil aproximou-se satisfatoriamente daque

1e (6,8%) obtido por espectroscopia de ressonância de carbono - 13. (Figs. 9 e 17).

Por não ter sido esclarecida a natureza da discordância entre os valores teóricos e experimental, a determinação de grupos *N*-acetil por processos químicos deverá ser reinvestigada, após um novo isolamento do polímero.

A quantificação das unidades de ácido urônico da fração OP-I foi realizada pelo método do carbazol, modificado por DISCHE³². Nesta dosagem, foi determinado experimentalmente que a presença de galactose no polímero acarretou uma interferência da ordem de 10%. Para corrigir tal interferência, a percentagem de ácido urônico obtida foi multiplicada por um fator de 0,9.

Um fator semelhante (13%) foi obtido, por BITTER & MUIR¹⁷ para corrigir a interferência da galactose, na determinação do ácido urônico pelo método do carbazol.

Os teores em açúcares da fração OP-I (Tabela III) foram expressos em termos de 100% de açúcar total, para que pudessem ser quantitativamente comparados com aqueles obtidos por espectroscopia de ressonância de carbono - 13 (Tabela IV).

A quantificação por espectroscopia r.m.n.-¹³C foi realizada através da estimativa percentual das áreas dos picos, atribuídos aos sinais do carbono anomérico de cada uma das unidades constituintes da fração OP-I.

Esse método analítico não acarreta destruição da amostra e, por conseguinte, pode fornecer valores percentuais bastante representativos da composição química de um heteropolissacarídeo.

TABELA IV

COMPOSIÇÃO QUÍMICA DAS FRAÇÕES OP-I e OP-pH 7 , DETERMINADAS PELOS MÉTODOS QUÍMICO E ESPECTROSCÓPICO (r.m.n.-¹³C).

CARBOIDRATOS	FRAÇÃO OP-I				FRAÇÃO OP-pH 7	
	Dosagem	Química	r.m.n.- ¹³ C		r.m.n.- ¹³ C	
	% ^b	Relação molar	% ^c	Relação molar	% ^c	Relação molar
Fucose	26,9	0,9	27,7	1,0	29,1	1,3
Galactose	26,9	1,0	28,2	1,0	22,3	1,0
<i>N</i> -Acetil-Glucosamina	24,9	1,1	20,4	0,7	21,5	1,0
Ácido Urônico	21,3	0,9	23,7	0,8	27,1	1,2

- ^a As metodologias utilizadas estão descritas na Tabela III;
- ^b Valores percentuais correspondentes aos descritos na Tabela III, expressos em termo de 100% de açúcar total;
- ^c Valores determinados a partir da contribuição percentual da área (peso em mg) do sinal de C-1 de cada unidade do polímero, sobre a somatória das áreas (peso em mg) de todos os sinais de C-1 presentes no espectro.
- ^d Relações molares calculadas em termos do percentual de galactose dos polímeros.

De fato, a quantificação obtida por ressonância de carbono - 13 (Tabela IV) confirmou os resultados fornecidos pela análise química. Entretanto, os métodos químicos empregados foram extremamente laboriosos e a constatação da correspondência entre os dois métodos consolida a análise espectroscópica (r.m.n.-¹³C) como uma alternativa rápida e eficiente na investigação estrutural de polissacarídeos complexos.

A relação molar de 1:1, obtida através da comparação entre as áreas (peso em mg) dos picos de C-1 da α -fucopirranose (δ 100,2) e do carbono C-1 da β -galactopirranose (δ 105,2), confirmou tal relação, anteriormente obtida por c.f.g.. Portanto, não houve diferença entre os métodos espectroscópico e cromatográfico, sugerindo que as condições de hidrólise ácida utilizadas (ácido sulfúrico 0,5M, por 12 h a 100°) não promoveram a destruição dos açúcares neutros.

Os valores percentuais de fucose, 27,4%, e de galactose, 28,2% (calculados pela somatória do peso das áreas de todos os sinais de C-1 presentes no espectro), foram concordantes com aqueles obtidos por métodos químicos (erro de 3%), conforme os dados da Tabela IV. Isto comprova que o método do fenol-ácido sulfúrico³⁹, com os fatores de correção apropriados, foi um método eficiente na determinação dos açúcares neutros neste polímero.

Os teores em hexosamina e ácido urônico da fração OP-I também foram determinados por espectroscopia de ressonância de carbono - 13, como descrito para os açúcares neutros. A área percentual do pico do carbono C-1 das unidades de hexosamina (δ 97,2) correspondeu a 20,3%, enquanto que a área percentual

do pico do carbono C-1 das unidades de ácido urônico (δ 103,4), correspondeu a 23,7%. Estas percentagens foram compatíveis àquelas obtidas por métodos analíticos, como demonstra os resultados da Tabela IV.

Tal ocorrência também foi evidenciada pelas relações molares de fucose, galactose, *N*-acetil-glucosamina e ácido urônico, obtidas por método químico (0,9:1,0:1,1:0,9) e por espectroscopia de ressonância de carbono - 13 (1,0:1,0:0,7:0,8) (Tabela IV).

A quantificação dos açúcares constituintes da fração OP-pH 7 também foi determinada pelo método espectroscópico, descrito para a fração OP-I, fornecendo uma relação molar de 1,3:1,0:1,0:1,2 entre as unidades de fucose, galactose, *N*-acetil-hexosamina e ácido urônico (Tabela IV).

Comparando-se as relações molares entre as duas frações, observa-se que houve uma diminuição nos teores de fucose, *N*-acetil-hexosamina e ácido urônico na fração OP-I. Esta perda foi compensada pelo aumento do teor destas unidades nas outras frações, eluídas da coluna de DEAE-celulose com o aumento da força iônica do eluente (Tabela I).

Embora estas frações não tenham sido bem caracterizadas, devido aos seus baixos rendimentos, os dados da Tabela I fortalecem a idéia de que os polissacarídeos isolados de oviduto-próstata de *M. paranaguensis* sejam, realmente, uma família de polímeros relacionados, apresentando os mesmos componentes em diferentes proporções e com distribuição de cargas distintas.

7. ANÁLISE DE METILAÇÃO DA FRAÇÃO POLISSACARÍDICA OP-I.

O polissacarídeo OP-I foi metilado pelos processos de HA WORTH⁶⁷ e KUHN et al⁷⁵ e o polímero per-*O*-metilado foi metanolisado. Os metil glicosídeos metilados foram hidrolisados com ácido sulfúrico 1*M* e analisados por c.f.g.-e.m. (coluna capilar DB-210, 50 + 2350, 400/minuto), na forma de acetatos de alditóis parcialmente *O*-metilados.

A fração OP-I, após metilação, foi tratada com hidreto de lítio e alumínio em tetrahidrofurano⁹, desde que o polímero metilado, sem prévia redução, não apresentou rendimento satisfatorio dos produtos de hidrólise. Nenhuma explicação plausível foi encontrada para tal fato, embora dificuldades na hidrólise ácida deste polímero (não reduzido) ou um processo de β -eliminação, via ácido urônico, possam justificar o baixo rendimento apresentado.

Em investigações posteriores, deverá ser comprovado, por processos adequados (espectroscopia no infra-vermelho e r.m.n. -¹³C), se o polímero metilado foi totalmente carboxi-reduzido. Após tal comprovação, a análise por c.f.g.-e.m. dos produtos de hidrólise do polímero metilado, antes e após submetê-lo a novo processo de metilação, utilizando iodeto de metila deuterado (ICD₃)⁴⁷ como agente metilante, poderá esclarecer qual participação das unidades de ácido urônico na estrutura do polímero.

Os dados de metilação da fração OP-I, referentes aos açúcares neutros, foram considerados satisfatorios, o mesmo não ocorrendo com as unidades de ácido urônico e de *N*-acetil-gluco-

samina (Fig. 18). Estes dados são, portanto, suficientes apenas para sugerir alguns aspectos estruturais para o polímero. A quantificação apresentada na Tabela V refere-se apenas aos açúcares neutros.

Dentre os dados de metilação referentes às unidades de fucose, foi comprovada por c.f.g.-e.m. a presença do derivado 1,4,5-tri-*O*-acetil-2,3-di-*O*-metil-fucitol (m/e 87, 117, 161, 203), IV⁷³, Este derivado indica uma alta proporção de unidades de fucose substituídas em 0-4 (45%) na mistura (Tabela V), cuja distribuição na estrutura do polímero não foi esclarecida.

Também foram identificados por c.f.g.-e.m. dois derivados mono-*O*-metilados de fucose, 1,2,4,5-tetra-*O*-acetil-3-*O*-metil-fucitol (3%, m/e 87, 159, 189, 203), V , e 1,3,4,5-tetra-*O*-acetil-2-*O*-metil-fucitol (6%, m/e 87, 117, 159, 231)⁷³, VI , cujos significados estruturais ainda não foram esclarecidos. Embora estes derivados possam indicar pontos de ramificação da molécula, tal sugestão deverá ser confirmada por outros processos analíticos, como a hidrólise ácida parcial.

A análise de metilação não evidenciou a presença de fucose como unidade terminal não redutora, desde que nenhum derivado tri-*O*-metilado de fucose foi detectado por c.f.g.-e.m.. A identificação de uma alta percentagem (31%) do derivado 1,5-di-*O*-acetil-2,3,4,6-tetra-*O*-metil-galactitol (m/e 45, 117, 161, 205)⁷³, VII, indica que o polímero em estudo é bastante ramificado e que unidades de galactose participam em sua estrutura como grupos terminais não redutores.

Outros derivados metilados de hexose foram identificados por c.f.g.-e.m., cujas configurações não foram totalmente

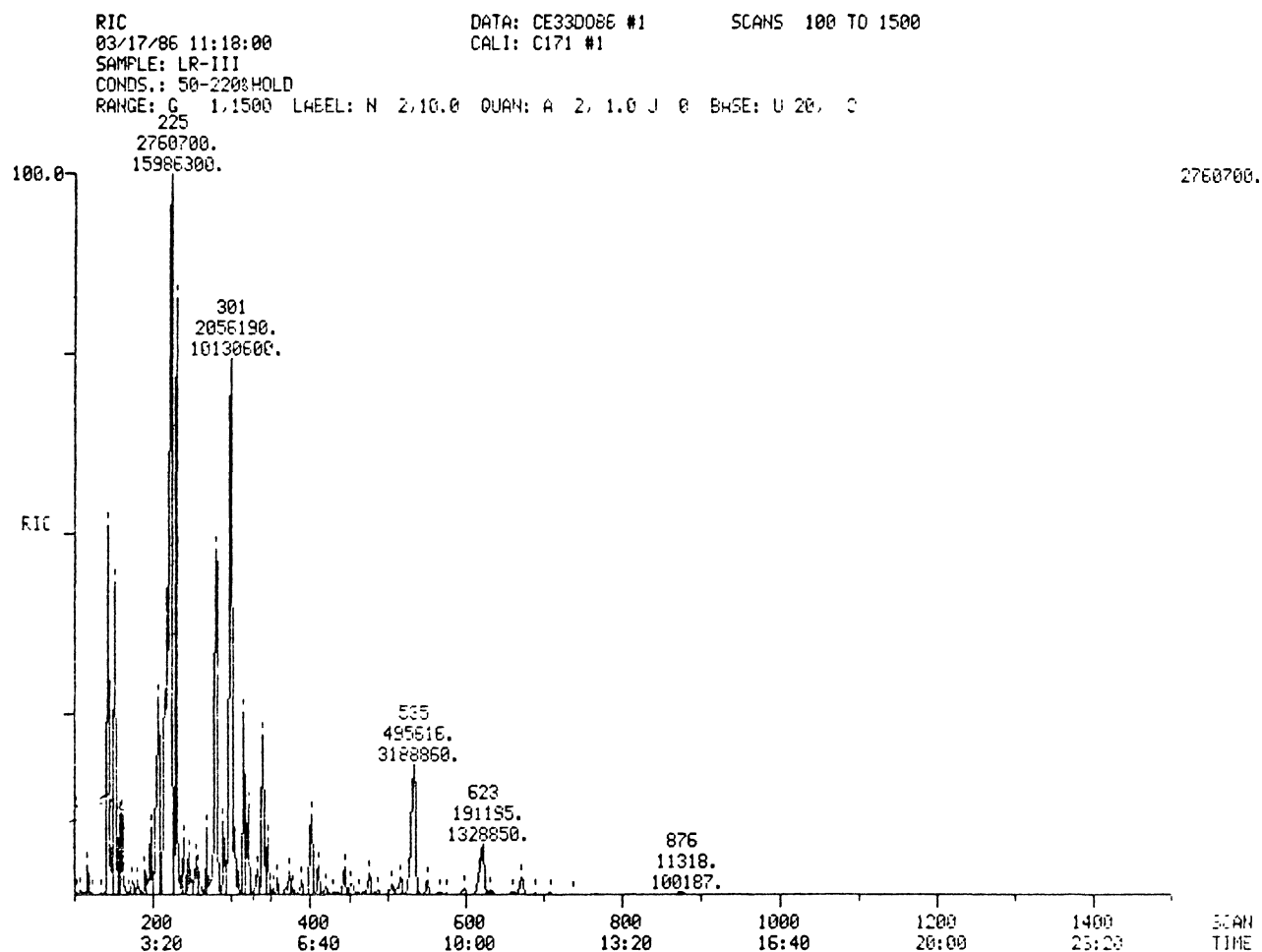
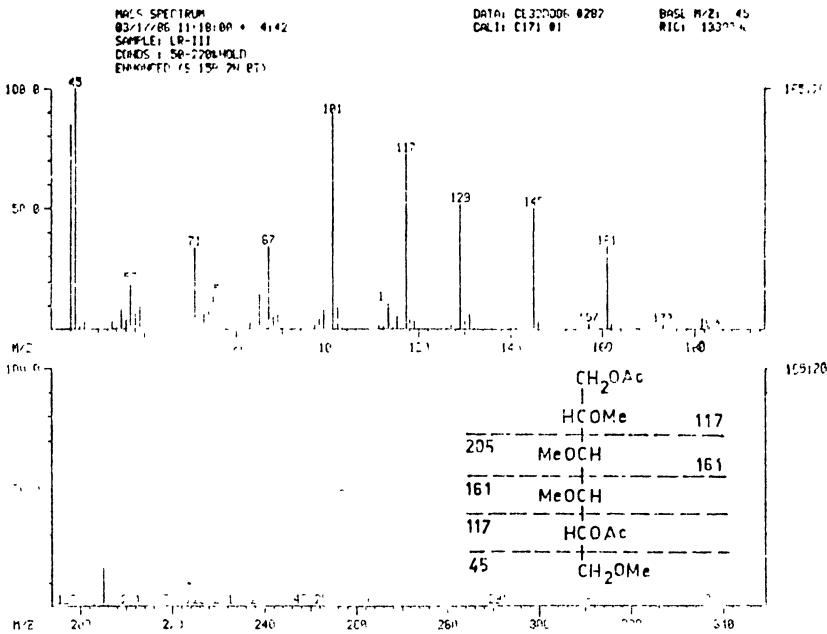


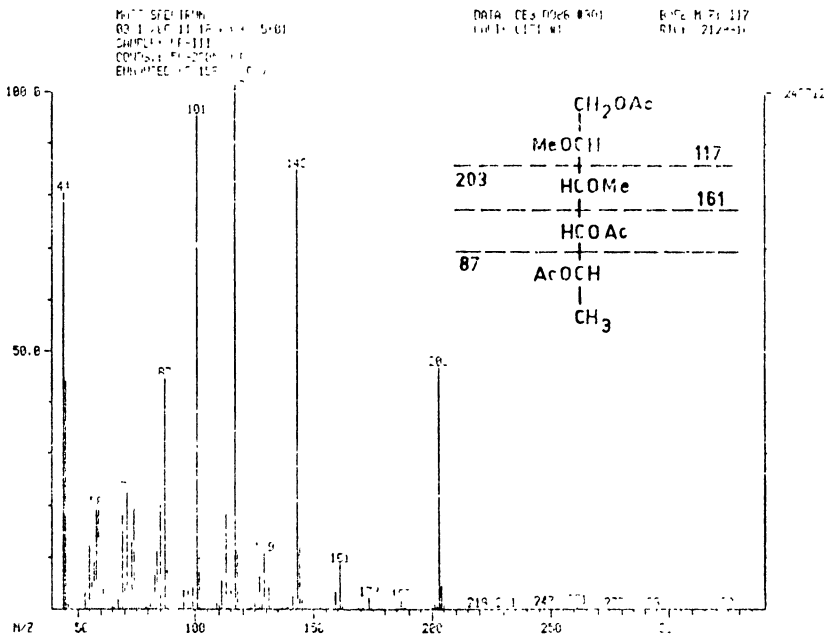
Fig. 18 - ANÁLISE POR c.f.g.-e.m. (COLUNA CAPILAR DB-210, 50-2350, 400/
 MINUTO) DOS PRODUTOS DE HIDRÓLISE ÁCIDA (H_2SO_4 1M, POR 7 h À
 1000) DA FRAÇÃO OP-I METILADA E REDUZIDA, NA FORMA DE ACETA-
 TOS DE ALDITÓIS PARCIALMENTE METILADOS.

282-	2,3,4,6 - Me ₄ -Gal	(VII)
301-	2,3-Me ₂ -Fuc	(IV)
323-	2-Me-Fuc	(VI)
342-	3,4,6-Me ₃ -Gal	(VIII)
347-	3-Me-Fuc	(V)
375-	2,3,4-Me ₃ -Hex	(XIII)
391-	4,6-Me ₂ - Hex	(X)
463-	2,3-Me ₂ - Hex	(XII)
488-	3,4-Me ₂ - Hex	(XI)
517-	2-Me-Hex	(IX)
739-	3,6-Me ₂ -GlcNMe	(XIV)

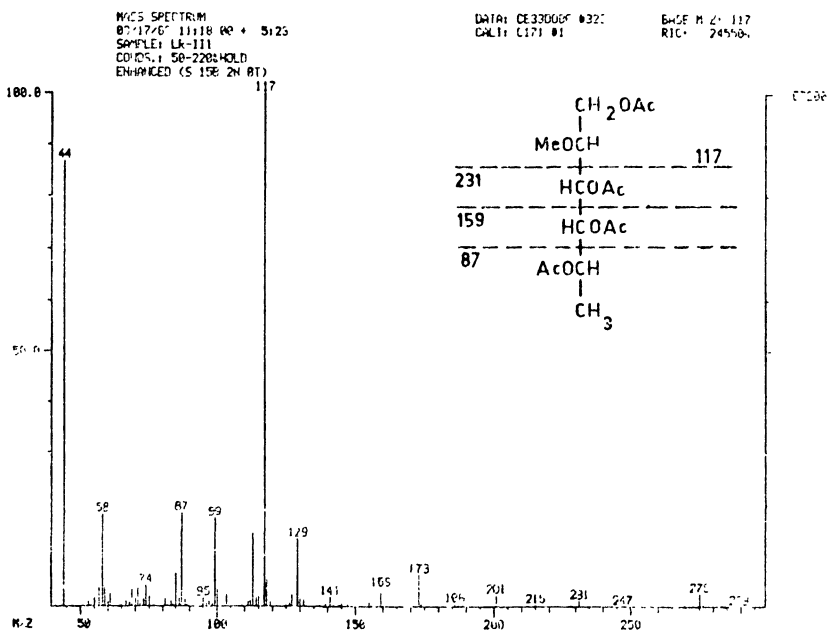
2,3,4,6-Me₄-Gal
(VII)



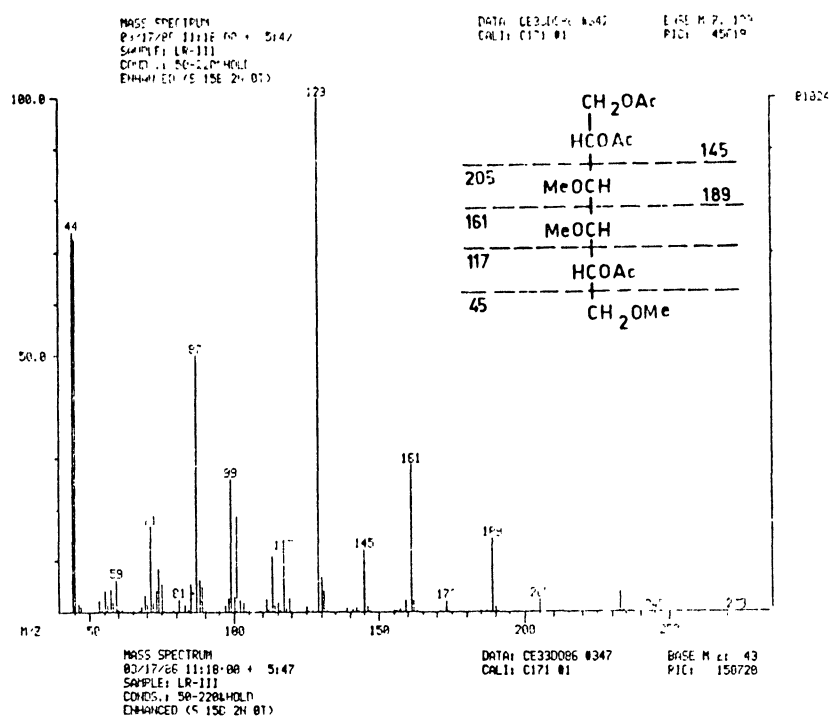
2,3 Me₂-Fuc
(IV)



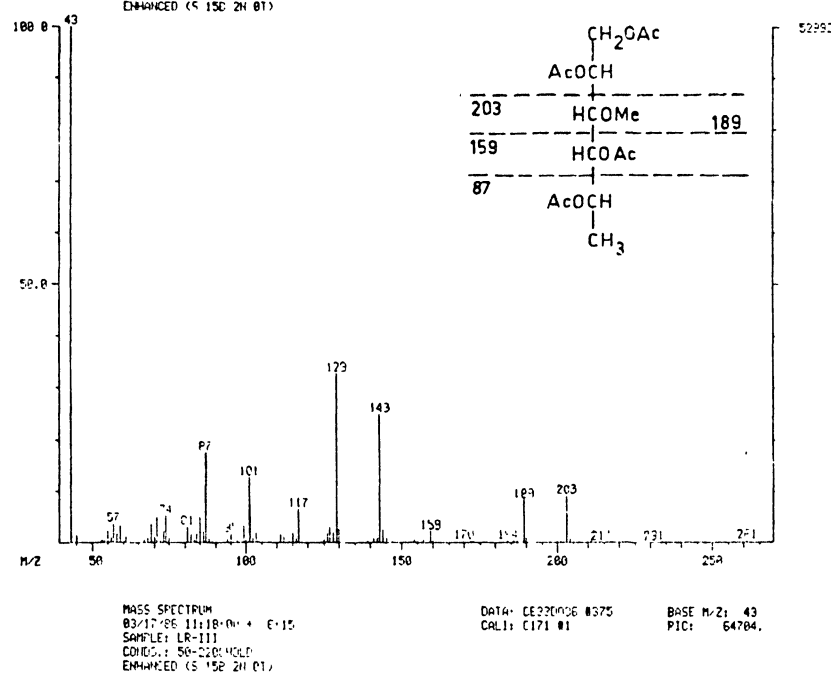
2-Me-Fuc
(VI)



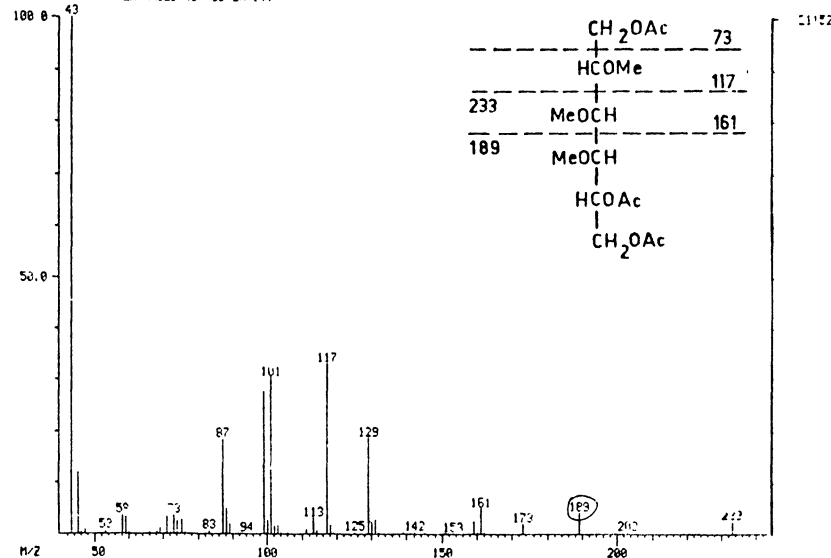
3,4,6-Me₃-Gal
(VIII)



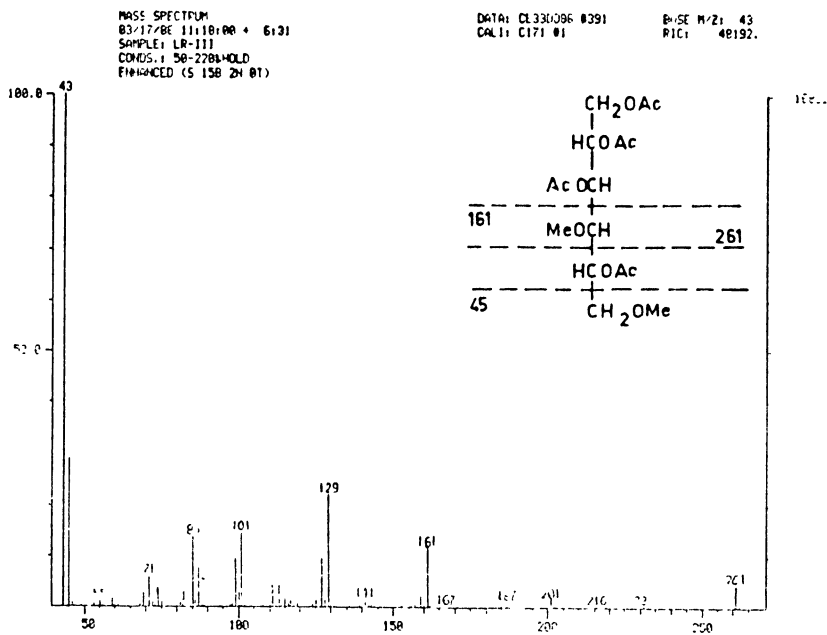
3-Me-Fuc
(V)



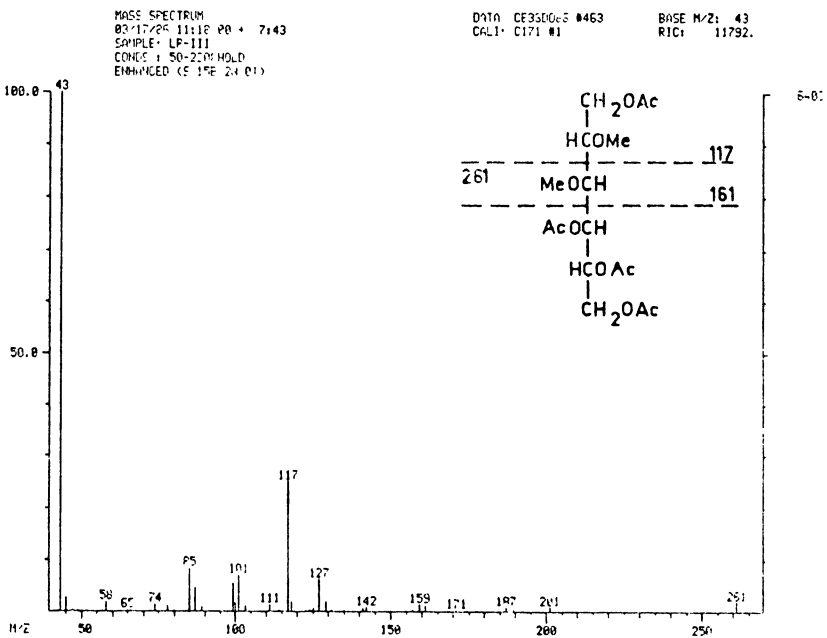
2,3,4-Me₃-Hex
(XIII)



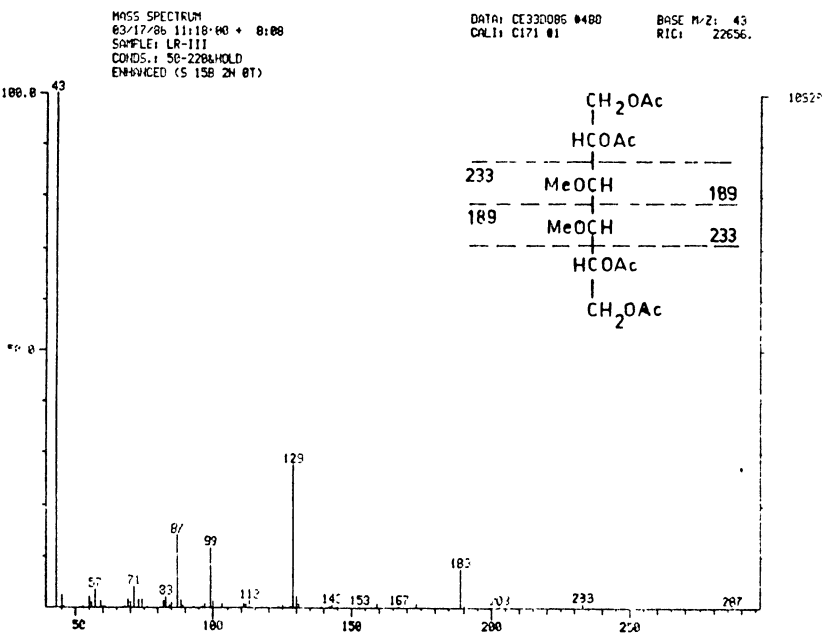
4,6-Me₂-Hex
(X)



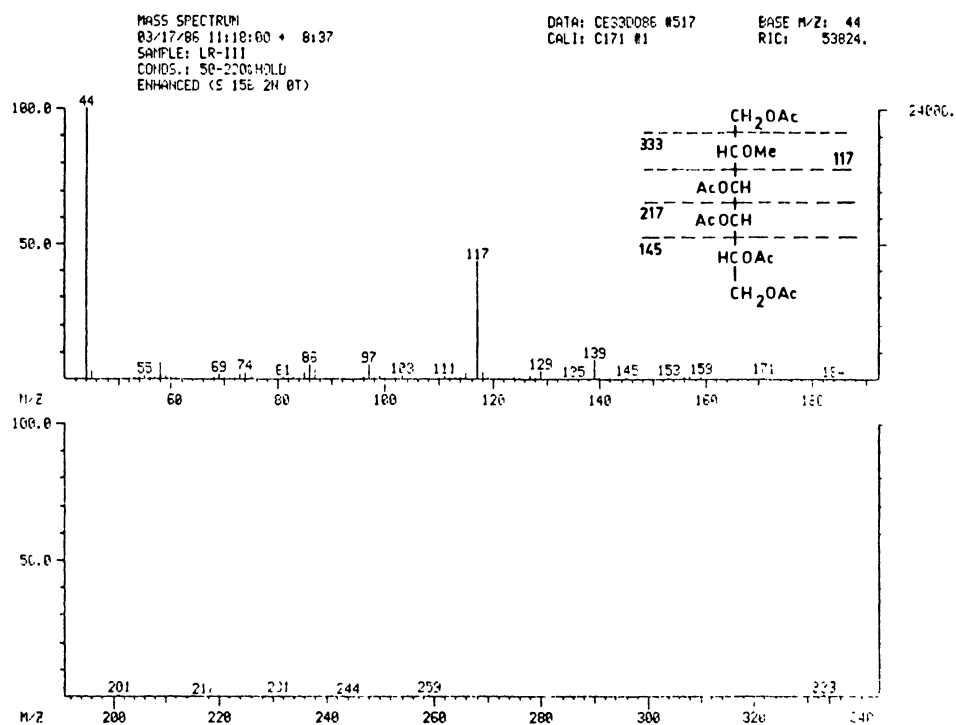
2,3-Me₂-Hex
(XII)



3,4-Me₂-Hex
(XI)



2-Me-Hex
(IX)



3,6-Me₂-GlcNMe
(XIV)

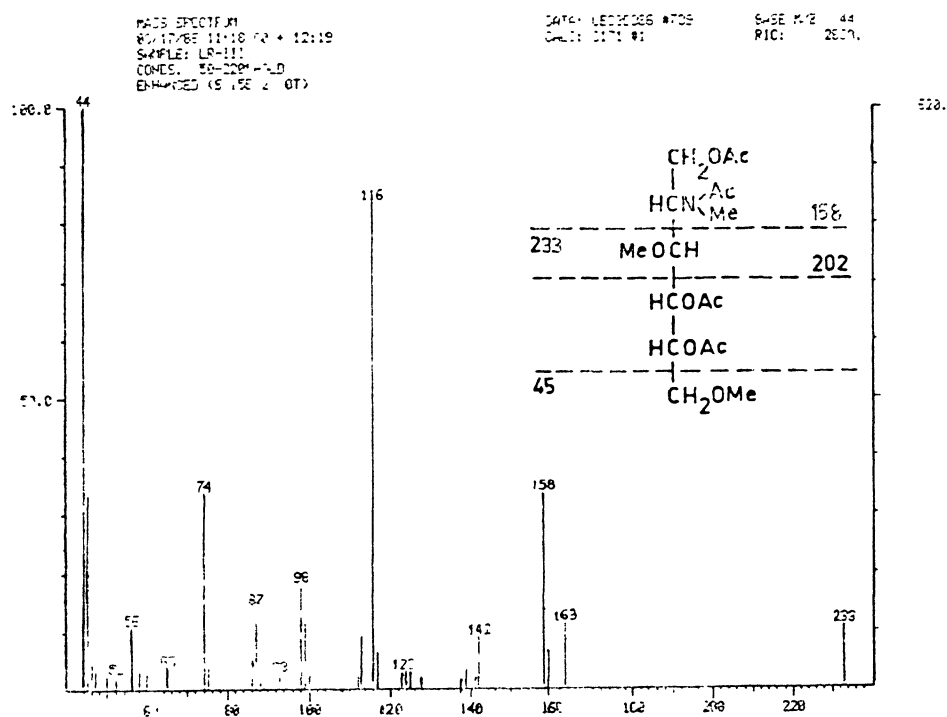


TABELA V

ANÁLISE POR c.f.g.-e.m.^a DOS PRODUTOS DE HIDRÓLISE ÁCI-
DA^b DA FRAÇÃO OP-I METILADA E REDUZIDA

O-metil-alditol acetilado ^c	T ^d	% ^e
2,3-Me ₂ -Fuc	1,12	45
2-Me-Fuc	1,20	6
3-Me-Fuc	1,29	3
2,3,4,6-Me ₄ -Gal	1,05	31
3,4,6-Me ₃ -Gal	1,27	11
2,3,4-Me ₃ -Hex	1,39	3
2,3-Me ₂ -Hex	1,72	+
4,6-Me ₂ -Hex	1,45	+
3,4-Me ₂ -Hex	1,82	+
2-Me-Hex	1,92	2
3,6-Me ₂ -GlcNMe	2,75	+

^a Coluna capilar DB-210, 50-2350, 400/minuto;

^b Hidrólise com ácido sulfúrico 1M, por 7 horas a 1000;

^c 2,3-Me₂-Fuc = 1,4,5-tri-O-acetil-2,3-di-O-metil-fucitol,etc.;

^d Tempos de retenção relativos ao 2,3,4,6-Me₄-Gal ;

^e Valores percentuais referentes apenas aos derivados metilados de açúcares neutros com sentido quantitativo, identificados através de seus espectros de massa (i.e.).

+ Traços.

estabelecidas. Destes derivados, o mais abundante (11%) foi o 1, 2,5-tri-*O*-acetil-3,4,6-tri-*O*-metil-hexitol (m/e 45,117,145,161, 189,205)⁷³, VIII. Análise posterior por c.f.g. (coluna convencional ECNSS-M, 170°), com o auxílio de um padrão sintético, demonstrou que tal hexitol correspondia ao galactitole não ao glucitol. Estes dados indicam que parte das unidades de galactose encontram-se distribuídas internamente no polímero, apresentando substituição em 0-2.

Os demais derivados metilados de hexose eram constituídos de unidades mono, di e tri-*O*-metiladas, respectivamente: 1, 3,4,5,6-penta-*O*-acetil-2-*O*-metil-hexitol (m/e 117,145,217,333), IX ; 1,2,3,5-tetra-*O*-acetil-4,6-di-*O*-metil-hexitol (m/e 45,161, 261), X ; 1,2,5,6-tetra-*O*-acetil-3,4-di-*O*-metil-hexitol (m/e 189 , 233), XI ; 1,4,5,6-tetra-*O*-acetil-2,3-di-*O*-metil-hexitol (m/e 117, 161,261), XII ; 1,5,6-tri-*O*-acetil-2,3,4-tri-*O*-metil-hexitol (3% , m/e 73,117,161,189,233), XIII⁷³.

A configuração destes derivados não foi estabelecida, em virtude de seus baixos rendimentos, necessitando de dados adicionais para serem melhor discutidos, do ponto de vista estrutural.

Com respeito às unidades de *N*-acetil-glucosamina, os dados de metilação indicaram apenas a presença em pequena proporção do derivado metilado 1,4,6-tri-*O*-acetil-2-deoxi-3,6-di-*O*-metil-2-metilacetamido-glucitol (m/e 144,289,360)¹⁰⁷, XIV, obtido em baixo rendimento provavelmente devido a insuficiência do processo de hidrólise (ácido sulfúrico 1*M* por 7 horas a 100°). Este dado demonstrou que estas unidades se encontram distribuídas internamente na estrutura do polímero, apresentando substituição em 0-4. A ausência do derivado tri-*O*-metilado da *N*-acetil-glucosamina exclui sua participação como grupo terminal não redutor.

Os dados de metilação não forneceram nenhuma informação sobre as unidades de ácido urônico. Isto já era esperado, pois a coluna capilar DB-210 (c.f.g.), selecionada para a análise dos produtos de metilação, é inadequada para investigar os derivados metilados de açúcares ácidos. Estes derivados são melhor analisados por c.p., utilizando um visualizador específico (cloridrato de *p*-anisidina).⁶⁹.

8. OXIDAÇÃO COM META-PERIODATO DE SÓDIO DA FRAÇÃO OP-I.

Como os dados de metilação forneceram uma quantificação parcial dos componentes da fração OP-I, a oxidação com periodato foi utilizada como um método complementar.

A determinação quantitativa do consumo de meta-periodato de sódio e da liberação de ácido fórmico, durante o processo oxidativo, foi realizada pelo processo descrito por NEUMÜLLER & VASSEUR⁹⁰. Nestas quantificações, foi utilizada a média ponderada dos pesos moleculares das unidades de açúcar anidro (PM = 173) constituintes do polímero, cuja amostra foi expressa em peso seco. As fórmulas utilizadas nestes cálculos estão descritas em materiais e métodos.

Um experimento paralelo foi realizado com metil galactosídeo, o qual apresentou um consumo de periodato e liberação de ácido fórmico semelhantes aos valores teóricos (1,94 moles/mol de periodato e 0,97 moles/mol de ácido fórmico).

O consumo de periodato da fração OP-I foi extrapolado para o tempo zero, a fim de corrigir alterações devidas a superoxidação, fornecendo um valor de 0,57 moles de periodato por mol

de açúcar anidro (Fig. 19). Durante a oxidação, foram liberados 0,17 moles/mol de ácido fórmico.

Considerando que cada unidade terminal não redutora ou unidade interna substituída em O-6 consomem dois moles de periodato e liberam um mol de ácido fórmico por mol de açúcar anidro, um consumo de 0,34 moles de periodato correspondem a estas unidades. Este consumo (0,34 moles) é atribuído principalmente às unidades terminais não redutoras do polímero, desde que somente uma pequena percentagem do derivado 1,5,6-tri-O-acetil-2,3,4-tri-O-metil-hexitol foi detectado dentre os produtos de metilação (3%).

Como a análise de metilação exclui a participação de *N*-acetil-glucosamina e de fucose como grupos terminais não redutores, foi sugerido que estas posições sejam provavelmente ocupadadas apenas por unidades de galactose.

Apesar dos dados de metilação não fornecerem informações sobre os ácidos urônicos, o baixo consumo de periodato observado (0,57 moles/mol), sugere que estas unidades não participam significativamente dos grupos terminais não redutores do polímero, mas estejam distribuídas internamente em sua maioria, com um tipo de substituição não suscetível à degradação com periodato.

Realmente, o sinal em δ 82,8, presente nos espectros de carbono - 13 das frações OP-pH 7 e OP-I, pode ser atribuído ao C-3 substituído do ácido urônico, desde que a análise de metilação exclui a presença de substituição em O-3 para as unidades de galactose, fucose e *N*-acetil-glucosamina ⁶¹.

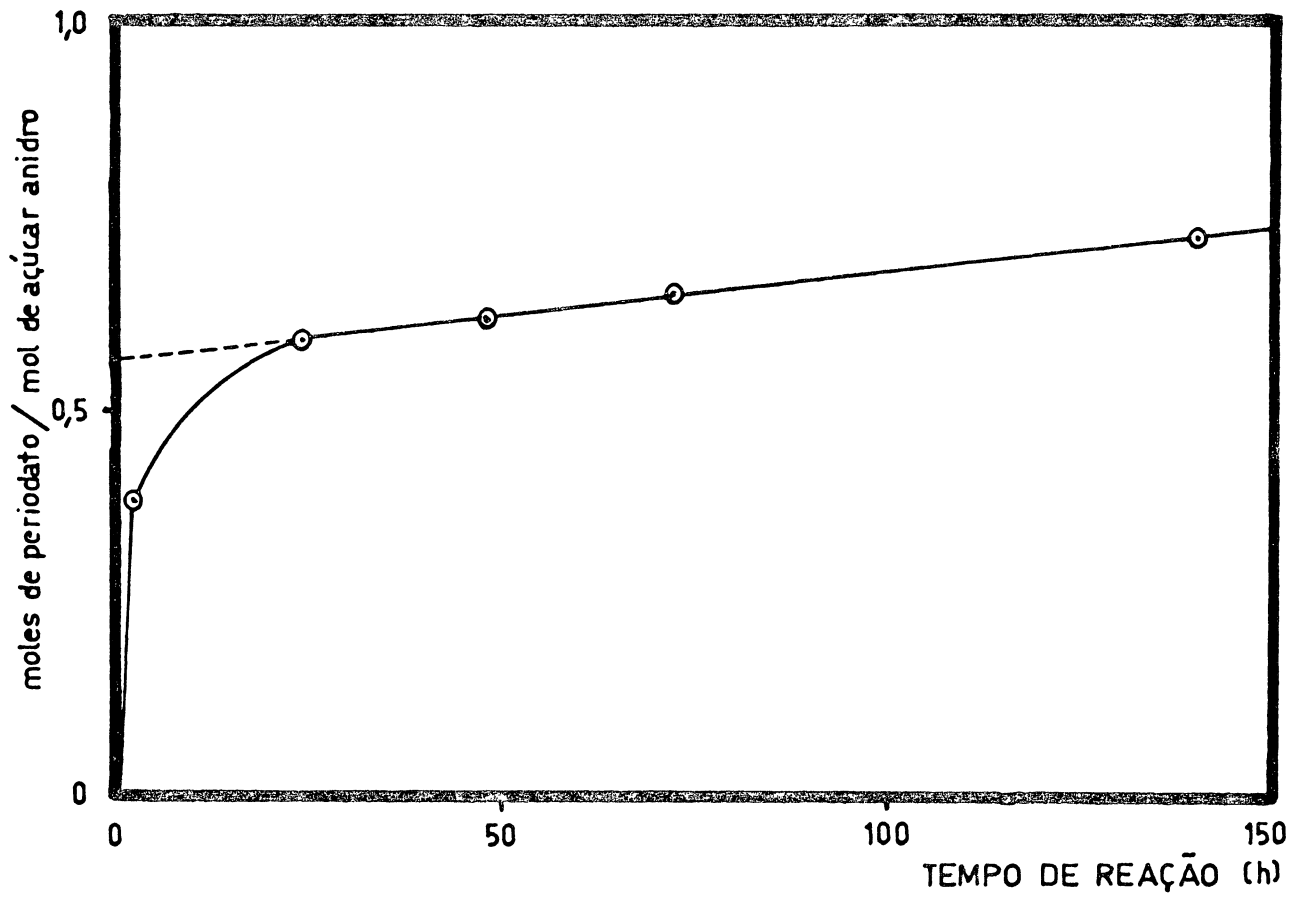


Fig. 19- CURVA DE OXIDAÇÃO COM META-PERIODATO DE SÓDIO DA FRAÇÃO OP-I

Realmente, o sinal em δ 82,8, excluindo-se substituição em 0-3 da galactose, fucose e *N*-acetil-glucosamina por metilação, pode ser atribuído ao C-3 substituído do ácido urônico.

Os dados de oxidação com periodato também indicaram que uma percentagem das unidades de polímero (0,23 moles/mol de periodato) não liberam ácido fôrmico no processo degradativo, as quais correspondem provavelmente às unidades substituídas em 0-2 e 0-4.

De fato, unidades de galactose substituídas em 0-2 e, unidades de fucose e *N*-acetil-glucosamina substituídas em 0-4, foram comprovadas por metilação e por espectroscopia de r.m.n.- ^{13}C .

Em virtude da galactose e do ácido urônico não apresentarem substituição em 0-4, os sinais em δ 82,2 e δ 79,8, observados nos espectros de r.m.n. ^{13}C do polímero em estudo, provavelmente estão relacionados ao 0-4 substituído da fucose e da *N*-acetil-glucosamina, respectivamente ⁶¹.

9. DEGRADAÇÃO DE SMITH (HIDRÓLISE TOTAL) DA FRAÇÃO POLISSACARÍDICA OP-I.

A fração OP-I foi também submetida à degradação de Smith, a fim de se obter maiores evidências estruturais, que comprovasem os dados fornecidos pelas análises anteriores. Após oxidação com ~~meta~~-periodato de sódio e redução com boroidreto de sôdio, o polímero foi hidrolisado (ácido sulfúrico 1M a 100°) e analisado por c.f.g. (coluna ECNSS-M, com programação de temperatura), na forma de acetatos de alditóis.

Os dados de degradação de Smith desta fração foram real-

mente compatíveis com os dados de metilação (Fig. 20A). A alta percentagem relativa de glicerol, observada neste processo degradativo, origina-se das unidades de galactose terminais não redutoras e daquelas substituídas em 0-2, as quais foram comprovadas pela análise de metilação.

Os dados atuais não permitem excluir a presença de ácido urônico nestas posições, desde que o produto resultante de sua degradação (ácido 2,3-dihidróxi-propanóico) não é detectado no processo analítico utilizado (c.f.g., coluna convencional ECNSS-M, 120 → 1800, 40/minuto).

A presença de 4-deoxi-treitol entre os produtos de degradação oxidativa da fração OP-I foi confirmada por análise cromatográfica (c.f.g.), utilizando-se uma amostra sintética deste derivado como padrão de referência (na forma de tri-*O*-acetil-4-deoxi-treitol), (Fig.20B). Isto confirma a ocorrência de fucose substituída em 0-4 neste polímero (Esquema XV), como assinalado pela análise de metilação.

Vale ressaltar que a degradação oxidativa da fração OP-I forneceu uma relação molar (c.f.g.) aproximada de 1:1 entre 4-deoxi-treitol e glicerol. Considerando que o glicerol, de acordo com os dados de metilação, origina-se das unidades de galactose terminais não redutoras e daquelas substituídas em 0-2, esta relação é uma boa indicação de que a fucose em 0-4 encontra-se na mesma proporção que as unidades geradoras de glicerol.

Nos produtos desta degradação também foram identificadas pequenas proporções de treitol, fucose e galactitol, além de dois componentes não identificados.

A presença de pequenas proporções de fucose e galactose

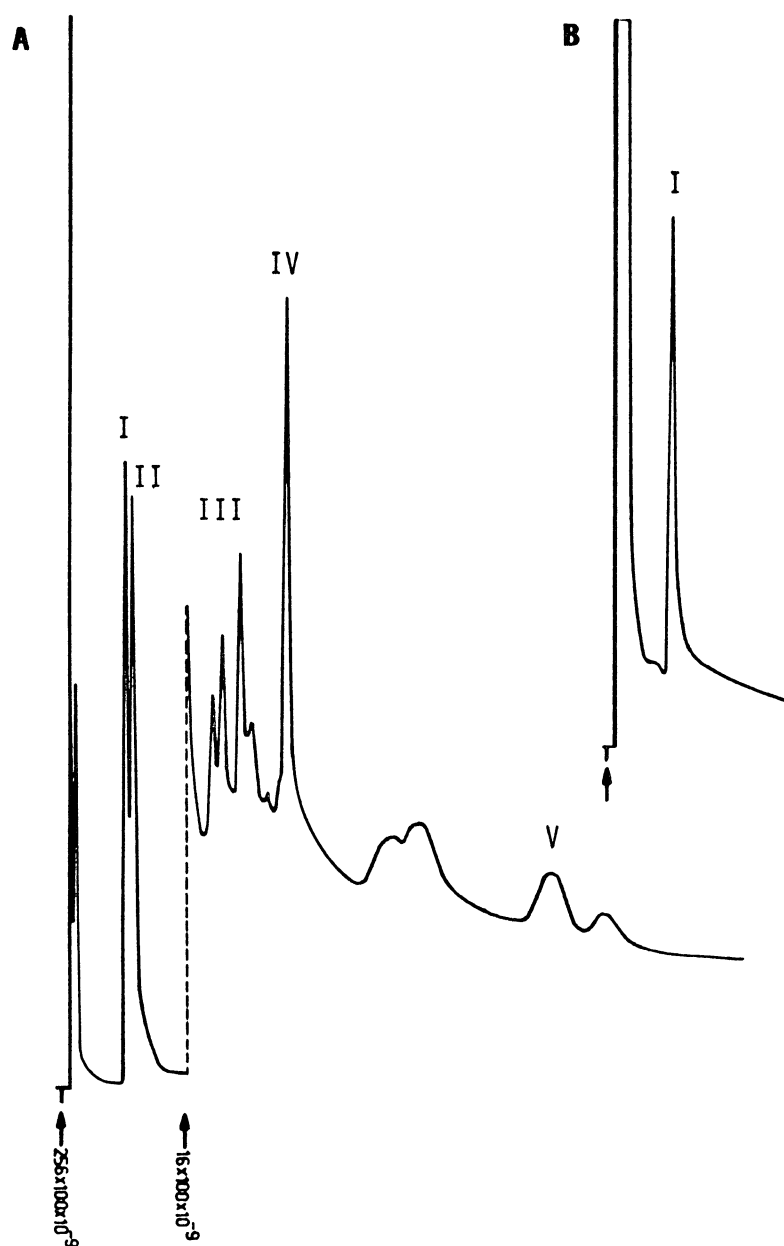


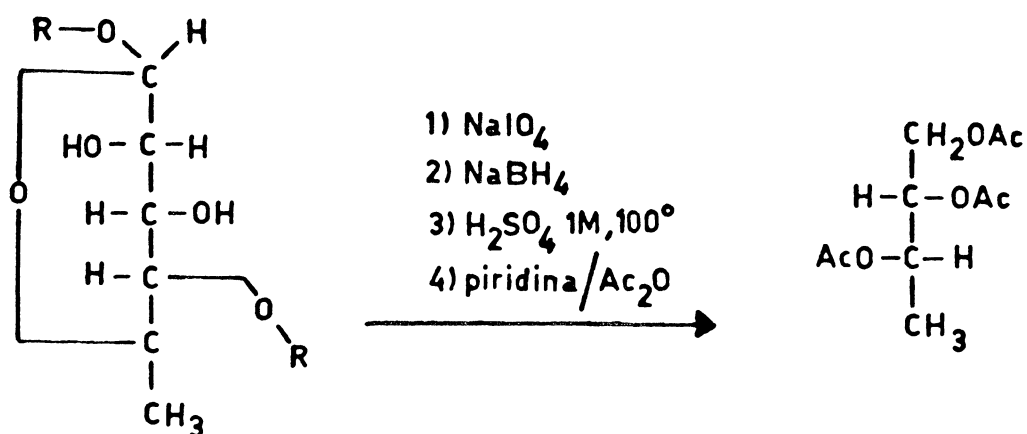
Fig. 20 - A - ANÁLISE POR c.f.g. (COLUNA CONVENCIONAL ECNSS-M A 3% EM CHROM. Q, 120→180°, 4°/MINUTO) DOS PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO DE SMITH (HIDRÓLISE TOTAL) DA FRAÇÃO OP-I.

B - ANÁLISE POR c.f.g. (MESMAS CONDIÇÕES) DO DERIVADO SINTÉTICO 4-DEOXI-TREITOL PER-O-ACETILADO.

- I - 4-deoxi-treitol tri-O-acetato;
- II - glicerol tri-O-acetato
- III - tetritóis tetra-O-acetatos
- IV - fucitol penta-O-acetato
- V - galactitol hexa-O-acetato

não suscetíveis à oxidação com periodato é compatível com os dados de metilação, no que se refere aos derivados mono e di-*O*-metilados destas hexoses, respectivamente.

O processo degradativo não forneceu nenhuma informação sobre os ácidos urônicos e hexosaminas.



L-fucosil
4-O-substituído

tri-O-acetil-desoxi-
L-treitol

10. FATORES QUE INFLUENCIAM A HIDRÓLISE ÁCIDA DE LIGAÇÕES GLICOSÍDICAS.

A constituição heterogênea de certos polissacarídeos (heteropolissacarídeos) dificulta sensivelmente o estabelecimento da composição química e de sua estrutura, devido ao comportamento diferenciado de suas unidades constituintes. Dentre os processos empregados para tais fins, a hidrólise ácida é uma das metodologias mais largamente empregadas.

A liberação quantitativa dos monossacarídeos constituintes da fração polissacarídica, isolada de oviduto-próstata de *M. paranaguensis*, foi uma tarefa difícil, desde que as ligações glicosídicas envolvidas são hidrolisadas em diferentes velocidades e os monossacarídeos liberados variam consideravelmente em sua estabilidade frente a ácidos.

Deste modo, os mecanismos de hidrólise ácida destas ligações são múltiplos e complexos, dos quais discutiremos alguns aspectos cinéticos, relacionados com a hidrólise de ligações glicosídicas de hexoses e seus derivados. Alguns destes mecanismos provavelmente estão envolvidos na hidrólise ácida do polímero em estudo e nortearão as investigações posteriores sobre hidrólise ácida parcial.

Devido ao seu caráter acetálico, os glicosídeos são passíveis de serem hidrolisados a açúcares livres pelo tratamento

com ácidos em meio aquoso. No entanto, alguns substituintes , principalmente nos carbonos C-2 e C-5 do anel, modificam significativamente seu comportamento frente a ácidos.

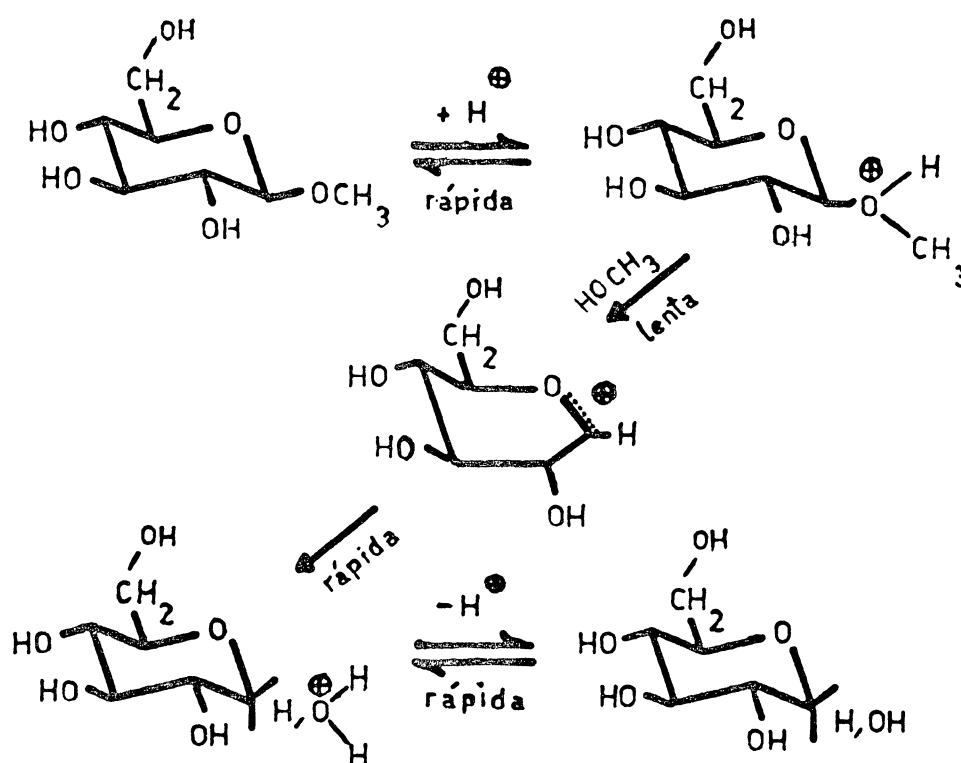
Numerosas investigações foram realizadas a partir dos trabalhos pioneiros de ARMSTRONG & GLOVER⁸ , visando estabelecer um mecanismo de reação, capaz de explicar a diversidade de comportamentos dos diversos tipos de glicosídeos, durante a hidrólise ácida.

NATH & RYDON^{8,9} determinaram a velocidade de hidrólise, a uma concentração fixa de ácido, de uma série de fenil β -D-glicopiranosídeos substituídos e demonstraram que substituintes receptores ou doadores de elétrons no núcleo benzênico promoviam, respectivamente, um pequeno aumento ou um pequeno decréscimo na velocidade de hidrólise.

O mecanismo para a hidrólise ácida de glicosídeos proposto por EDWARD^{4,5} , foi experimentalmente comprovado por VERNON e colaboradores^{7,12,24} e posteriormente confirmado por OVEREND e colaboradores^{11,91}. As etapas deste mecanismo iniciam-se com: (a) formação de seu ácido conjugado, através da protonação do átomo de oxigênio glicosídico; (b) heterólise da ligação entre o carbono anomérico e o oxigênio glicosídico, gerando um carbocâtion cíclico; (c) solvatação do carbocâtion, fornecendo o açúcar redutor e restituindo um próton à solução, XVI.

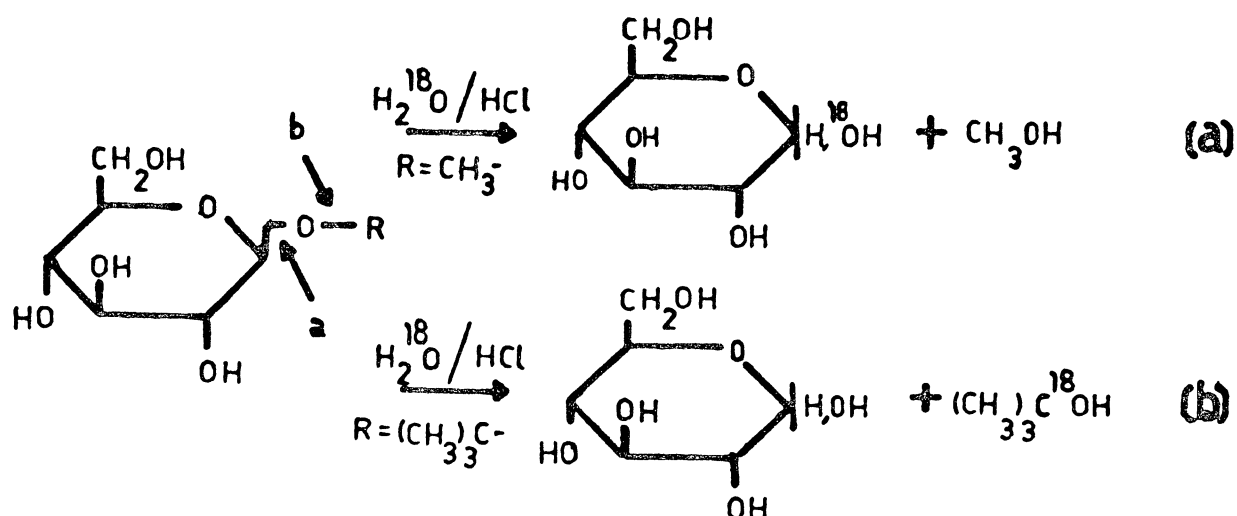
Entretanto, o tipo da aglicona pode influir no mecanismo de hidrólise de um glicosídeo. Seu efeito está relacionado à capacidade em formar um carbocâtion mais estável que o carbocâtion glicosídico. Nestes casos excepcionais, a ligação entre o oxigênio glicosídico e a aglicona será rompida preferencialmen

te, durante a etapa de heterólise. Este mecanismo foi observado por ARMOUR *et al.*⁷ para a hidrólise do *tert*-butil β -D-glucopiranosídeo e outros derivados similares, através de técnicas de marcação isotópica, XVII. Apesar de comprovado para a hidrólise ácida de glicosídeos sintéticos, este mecanismo não foi observado em carboidratos *in natura*.



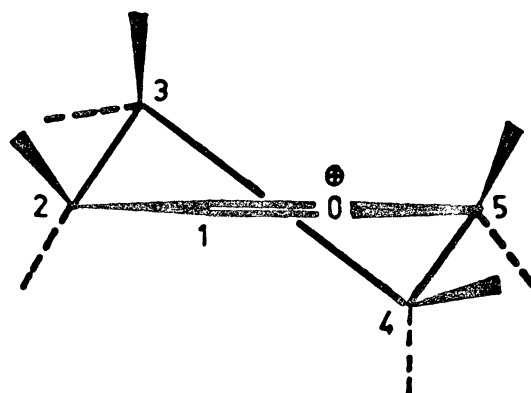
XVI

Baseado em princípios cinéticos, a energia de ativação de uma reação química será tanto menor quanto maior for a estabilidade do estado intermediário. Por analogia, quanto maior a estabilidade do carbocátion formado no processo hidrolítico, mais facilmente será hidrolisada a ligação glicosídica do composto correspondente.

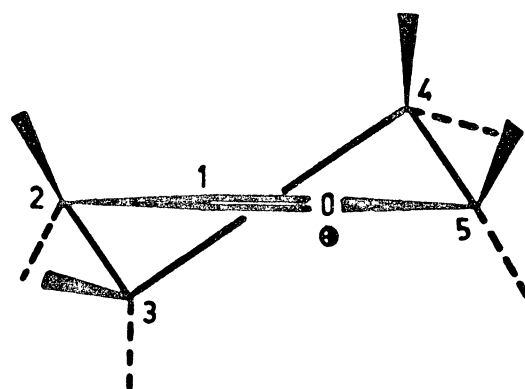


Admite-se que a conformação do carbocâtion seja do tipo ${}^3_{H_4}$ ^{45,110,111,112}, denominada de conformação em semi-cadeira, onde os carbonos C-1, C-2, C-5 e o oxigênio do anel encontram-se no mesmo plano XVIII. Isto se deve à hibridação sp^2 assumida pelo carbono anomérico, após a etapa de heterólise. O efeito mesomérico envolvendo o par eletrônico não ligante do oxigênio do anel, que faculta características de insaturação a esta ligação, explica a conformação assumida pelo intermediário. A conformação XVIII ocorre somente quando a hexose correspondente é do tipo 4C_1 , sendo 4H_3 para hexoses na conformação 1C_4 ⁴⁵, XIX.

A formação deste intermediário corresponde à etapa determinante da velocidade de reação, para hidrólise de glicosídeos. Esta etapa depende da concentração do ácido conjugado, a qual, juntamente com outros parâmetros cinéticos, sugere unimolecularidade ao mecanismo XX^{15,111}.



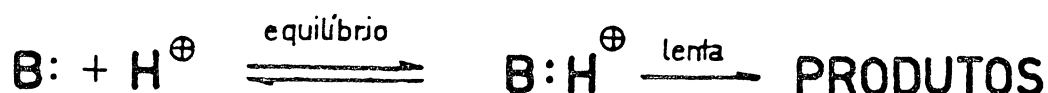
XVIII



XIX

A entropia da ativação positiva, observada por OVEREND *et al.*⁹¹ para a hidrólise de vinte e quatro piranosídeos é, também, uma forte evidência que esta reação ocorra segundo um mecanismo unimolecular. Valores positivos da entropia de ativação significam maiores restrições à liberdade de passagem das moléculas, do estado fundamental para o estado intermediário

da reação, através de um estado de transição. Portanto, a entropia de ativação será positiva quando o intermediário (carbocâtion) for menos organizado do que o estado fundamental (ácido conjugado) da reação, ou seja, quando o processo de ativação a um intermediário polar acarrete uma perda na energia interna do sistema.

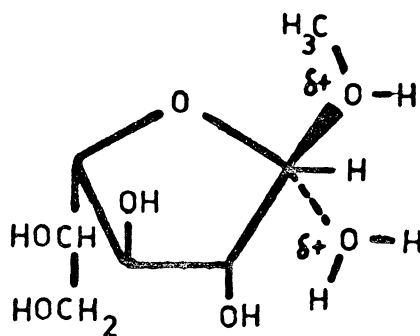


MECANISMO UNIMOLECULAR

XX

Por outro lado, valores negativos para a entropia de ativação foram observados na hidrólise ácida de furanosídeos⁹¹. CAPON e THACKER²⁵, investigando a hidrólise ácida de vários metil furanosídeos, demonstraram que o valor médio da entropia de ativação destas estruturas era de vinte a trinta unidades inferior ao valor médio observado para metil piranosídeos.

O anel furanosídico forma carbocâtions estáveis muito mais facilmente que o anel piranosídico¹⁵. Esta estabilidade é relacionada a sua grande capacidade em acomodar um carbono híbrido em sp^2 . Embora este mecanismo não esteja bem esclarecido, os valores negativos da entropia de ativação sugerem que os metil furanosídeos sejam hidrolisados por um mecanismo distinto, envolvendo uma etapa de heterólise bimolecular, XXI.^{15,78,91}



XXI

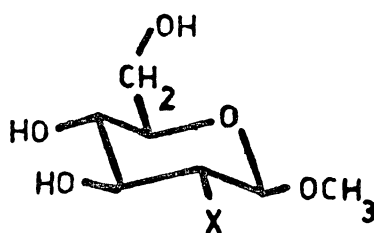
Certos substituintes alteram a velocidade de hidrólise de glicosídeos, através do efeito que exercem sobre a estabilidade conformacional do estado intermediário. Estes efeitos, devidos a mecanismos eletrônicos e de impedimento estérico, são mais pronunciados quando a substituição ocorre nos carbonos C-2 e C-5.

Os mecanismos eletrônicos são devidos à presença de substituintes doadores ou receptores de elétrons no anel, enquanto que o impedimento estérico refere-se aos fatores de instabilidade conformacional, conferidos ao estado intermediário pela presença de substituintes volumosos.

Quando um substituinte no carbono C-2 for receptor de elétrons, seu efeito indutivo sobre o carbono anomérico reduzirá a disponibilidade do par eletrônico não ligante do oxigênio glicosídico, dificultando sua protonação. Este efeito será responsável, não só pela diminuição da concentração do ácido conjugado, como também pelo retardamento da etapa de heterólise, devido a formação de um carbocâtion menos estável. Portanto, a velocidade de hidrólise de glicopiranosídeos está numa relação

inversa com o aumento da capacidade de seus substituintes em atrair elétrons.

Desta forma, o metil 2-deoxi- β -*arabino*-hexopiranosídeo ($X=H$, XXII) é hidrolisado muito rapidamente em meio ácido, mas a substituição do átomo de hidrogênio do carbono - 2 por uma hidroxila ($X=OH$, XXII), causa um decréscimo relativo de duzentas vezes na velocidade de hidrólise do glicosídeo⁵¹. Uma alteração desta ordem não poderia ser explicada apenas através de um impedimento estérico da hidroxila, sugerindo que um efeito eletrônico seja o mecanismo predominante.

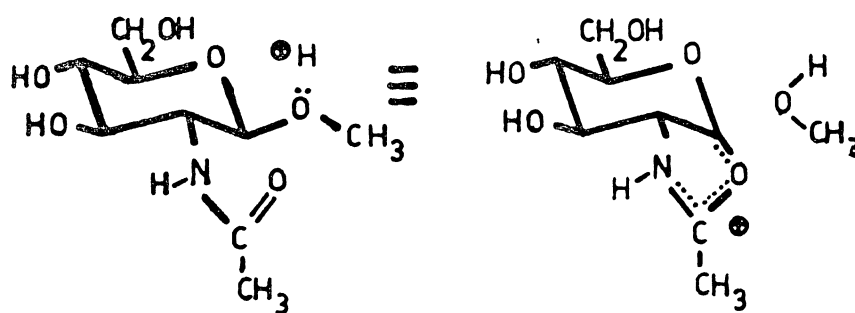


XXII

Como poderia ser previsto, a substituição da hidroxila do carbono C-2 de um hexopiranosídeo por uma função amina ($X = NH_2$, XXII), que resulta num poderoso grupo receptor de elétrons ($X = NH_3^+$, XXII) em meio ácido, causa uma diminuição da ordem de 3×10^5 vezes na velocidade de hidrólise do glicosídeo⁵¹.

Geralmente, as unidades de 2-amino-2-deoxi-hexoses em polissacarídeos encontram-se *N*-acetiladas. O grupo *N*-acetamido é um receptor de elétrons menos efetivo que a função amina e, conseqüentemente, a hidrólise do metil 2-acetamido-2-deoxi- β -D-glucopiranosídeo ($X=NHAc$, XXII) é aproximadamente oitocentas vezes mais rápida que a hidrólise do 2-amino-2-deoxi-glucopiranosídeo não substituído⁵¹.

Embora este grupo ($X=\text{NHAc}$, XII) seja um receptor de elétrons pouco mais eficiente que o grupo hidroxila, o derivado *N*-acetamido é hidrolisado seis vezes mais rapidamente que o metil β -D-glucopiranosídeo correspondente⁵¹. Este efeito anômalo é explicado através de uma assistência anquimérica do grupo acetamido sobre o carbono anomérico, onde o átomo de oxigênio carbonílico participa diretamente na formação de uma estrutura anelar de cinco membros. Esta estrutura é capaz de estabilizar a deficiência de elétrons do carbocátion, através de um efeito mesomérico envolvendo a deslocalização dos elétrons da carbonila do grupo acetil e do par eletrônico não ligante do átomo de nitrogênio, XXIII



XXIII

Apesar da labilidade à hidrólise ácida, conferida aos 2-amino-2-deoxi-hexosídeos pela acetilação do grupo amino, MORGAN & ELSON⁸⁵ demonstraram que, em polissacarídeos formados por estas unidades, a remoção dos grupos acetil dá-se em condições de hidrólise (0,1M de ácido clorídrico, por 10 horas a 100°) insuficientes para a cisão de certos tipos de ligações glicopiranosídicas. Isto sugere que os mecanismos observados

na hidrólise de metil glicosídeos não podem ser, simplesmente, extrapolados para a hidrólise de polissacarídeos, sem que outros fatores sejam levados em consideração.

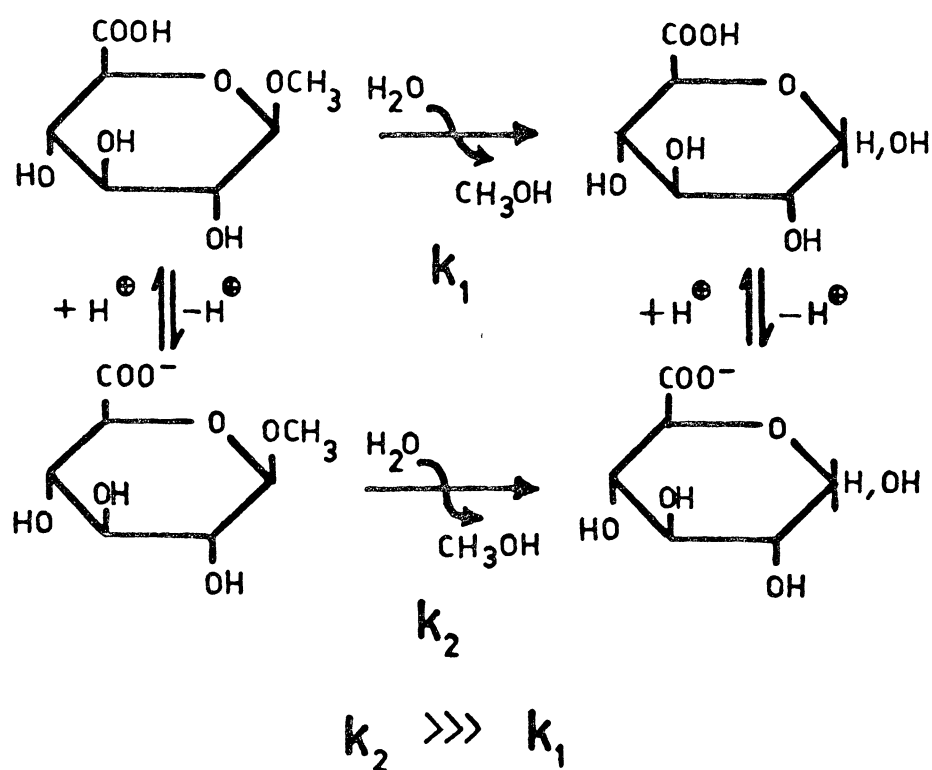
A ocorrência de grupos receptores de elétrons substituídos em posições do anel diferentes de C-2, influencia em menor extensão a velocidade de hidrólise ácida de glicosídeos.

De fato, a substituição de um grupo carboxílico, no carbono C-5 de um glicopiranosídeo, promove um efeito indutivo menor sobre os elétrons da ligação glicosídica, quando comparado ao efeito de um substituinte eletrofílico no carbono C-2.

Na verdade, os metil glicuronídeos são hidrolisados um pouco mais lentamente que os glicosídeos correspondentes. A investigação dos parâmetros cinéticos da hidrólise ácida de metil glicuronídeos demonstrou que ambas, a energia e a entropia de ativação, eram inferiores às aquelas observadas para a hidrólise dos respectivos glicosídeos⁴⁴. Estes dados, posteriormente confirmados por outros autores^{111,112}, explicam parcialmente o motivo de serem os metil glicuronídeos hidrolisados em velocidades próximas a dos seus glicosídeos, quando poderia-se esperar uma estabilidade muito maior dos glicuronídeos frente a ácidos.

Fatores conformacionais, relacionados à estabilidade do intermediário da reação pela substituição em C-5, devem influir no mecanismo de hidrólise ácida de metil glicuronídeos. Este efeito alternativo seria gerado por um impedimento estérico, exercido pelos substituintes sobre a estabilidade conformacional do carbocâtion. Deste modo, o efeito indutivo ou polar parece ser responsável apenas em parte pelo comportamento, frente a ácidos, de metil glicosídeos substituídos no carbono C-5.

Num comportamento similar aos ácidos carboxílicos, os metil glicuronídeos, em soluções ácidas diluídas, encontram-se em equilíbrio com uma baixa concentração de sua forma ionizada. O íon carboxilato é um grupo doador de elétrons e seu mecanismo indutivo exerce um efeito contrário ao observado para sua forma original, protonada. Esta propriedade de dissociação do grupo carboxílico está em concordância com a observação de que, em soluções muito diluídas de ácidos minerais, onde a concentração de íons carboxilato seja superior, os metil glicuronídeos serão hidrolisados mais rapidamente que os respectivos glicosídeos, XXIV⁶¹.

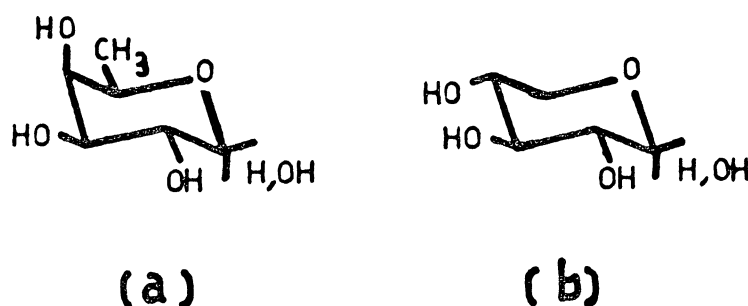


Portanto, substituintes doadores de elétrons no carbono C-5, a exemplo do íon carboxilato e do grupo metila, facilitam a hidrólise ácida dos respectivos metil glicosídeos.

A fucose é uma 6-deoxi-hexose, contendo a configuração *galacto* (6-deoxi-galactose). Diferenças na reatividade entre galactose e fucose são devidas a efeitos eletrônicos e de impedimento estérico, relacionados à substituição no carbono C-5 dos grupos hidroximetil e metil, respectivamente. Assim, o metil 6-deoxi- α -D-galactopiranosídeo é hidrolisado seis vezes mais rapidamente que o galactosídeo correspondente^{51,91}. Foi sugerido que a influência de fatores conformacionais sobre a estabilidade do carbocâtion seja, neste caso, mais significativa de que os efeitos eletrônicos envolvidos, embora estes não possam ser ignorados^{52,112}.

De fato, OVEREND *et al.*⁹¹ observaram que o metil α -D-fucopiranosídeo é hidrolisado mais rapidamente do que o metil α -L-arabinopiranosídeo, em solução 2M de ácido clorídrico a 60°. Este resultado era previsível, pois a conformação em semi-cade é mais facilmente assumida pelo arabinopiranosídeo (C-5,H,XXVb) do que pelo fucopiranosídeo (C-5, CH₃,XXVa).

TIMELL *et al.*¹¹² estudaram a influência sobre a velocidade de hidrólise ácida de metil glicosídeos, causada por substituintes no carbono C-5 com diferentes fatores de substituição polar. Seus resultados demonstraram que, em função das propriedades dos substituintes, o comportamento frente a ácidos dos metil glicosídeos correspondentes poderia ser explicado através de efeitos indutivos e/ou de impedimento estérico, mas dificilmente através de apenas um destes efeitos.



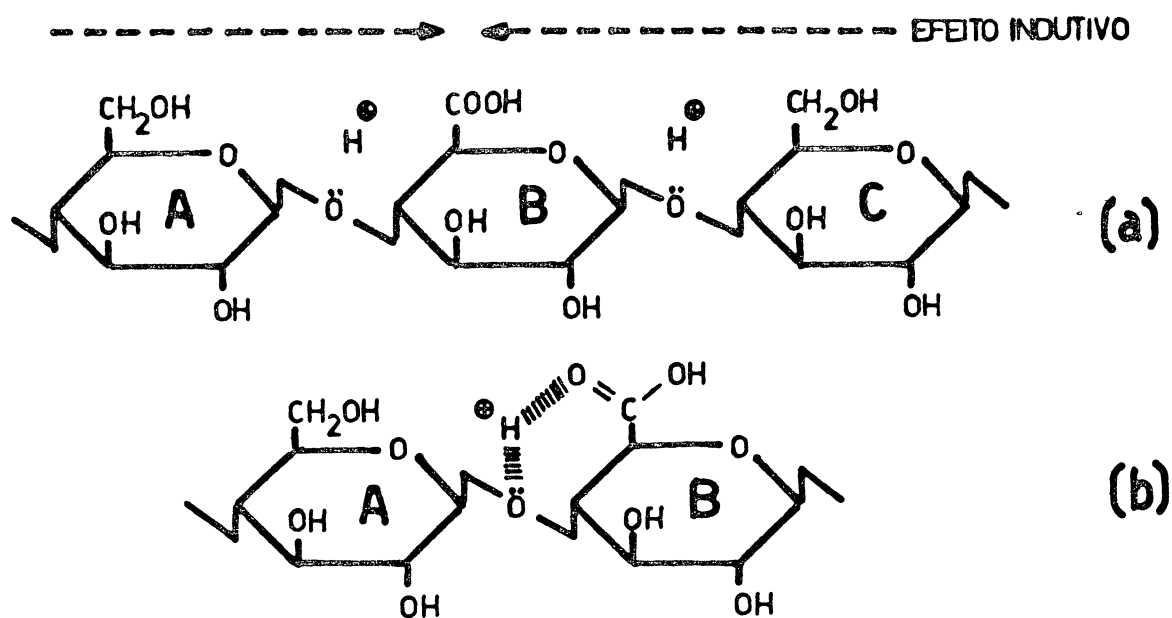
XXV

Outrossim, velocidades de hidrólise diferenciadas foram observadas para alguns metil glicuronídeos. Estes pesquisadores¹¹² demonstraram que o metil β -D-galacturonídeo foi hidrolisado sete vezes mais lentamente que o galactosídeo correspondente, enquanto que o metil α -D-manuronídeo foi hidrolisado duas vezes e meia mais rapidamente que o respectivo manosídeo. Já no estudo comparativo dos parâmetros cinéticos envolvidos na hidrólise ácida dos metil α -D-glucuronídeo, β -D-glucuronídeo e α -D-galacturonídeo e de seus respectivos glicosídeos, não foram observadas diferenças apreciáveis.

WHISTLER & RICHARDS¹¹⁵, investigando a resistência à hidrólise ácida da ligação glicosídica formada a partir de uma unidade de ácido urônico, numa fração hemicelulósica de *Pinus elliotii*, concluíram que ambos os efeitos, estérico e indutivo, têm importante função na estabilização desta ligação glicosídica.

A influência de substituintes no carbono C-5 em polissa-

carídeos foi também estudada por MARCHESSAULT & RANBY^{83,97}. Estes autores investigaram, particularmente, a influência do grupo carboxílico (ácidos urônicos) sobre a hidrólise ácida da celulose e de outros polissacarídeos. Para explicar o efeito indutivo destes substituintes e sua relação com a resistência à hidrólise ácida, foi proposto um modelo que está representado no Esquema XXVI.



XXVI

De acordo com este modelo, a ligação (A → B) é ativada pelo efeito indutivo do grupo carboxílico da unidade B, enquanto que a ligação (B → C) é estabilizada pelo efeito indutivo do mesmo grupo, que neste caso atua em direção oposta.

O modelo proposto XXVI sugere que o efeito indutivo do substituinte polar (eletro negativo) seja transmitido via um átomo de oxigênio (anelar) e dois átomos de carbono (C-5 e C-1)

da unidade B, o que parece uma extensão pouco provável para um efeito desta natureza ¹⁵. Mesmo a hipótese de que a estabilização da ligação (B → C) seja devida à deslocalização dos elétrons do oxigênio do anel B, diminuindo sua capacidade em compensar a deficiência em elétrons do carbocâtion intermediário, não justifica totalmente o fenômeno.

A labilidade à hidrólise ácida da ligação glicosídica (A → B), representada no Esquema XXVI pode também ser explicada através de um efeito estérico. Neste caso, o grupamento carbocíclico exerce uma assistência anquimérica sobre o oxigênio glicosídico, facilitando a etapa de protonação e sua consequente hidrólise em meio ácido.

A hidrólise ácida, tanto de glicosídeos como de polissacarídeos, deve ser realizada em soluções ácidas onde a concentração em carboidratos não ultrapasse 1% (um por cento) p/v, condição na qual o efeito da reversão ácida não é muito pronunciado ⁵¹.

Mesmo nestas condições, as unidades de hexose competem com o solvente pelo sítio eletrofílico do carbocâtion, podendo formar dissacarídeos em pequeno rendimento. Assim, quando uma solução de D-glucose (1%) em ácido mineral diluído (aproximadamente 0,15M) é aquecida, isomaltose (0,1%) é formada pelo ataque nucleofílico da hidroxila primária de uma unidade de D-glucose sobre o carbono anomérico de outra unidade. Outros dissacarídeos também podem ser formados, embora em menor rendimento, porque o ataque de hidroxilas secundárias é estericamente menos favorecido. Esta reação de condensação geralmente acompanha a hidrólise de glicosídeos e polissacarídeos, fornecendo

possíveis produtos de reversão ácida, além dos constituintes reais da molécula original⁵¹.

Baseado nos estudos realizados sobre metil glicosídeos, o mecanismo de hidrólise ácida de polissacarídeos também ocorre via um intermediário polar cíclico (carbocâtion glicosídico), mas apresentando peculiaridades conformacionais. Isto pode justificar a hidrólise preferencial das unidades terminais não reductoras, pois, a hidrólise ácida de uma ligação interna, ao contrário de uma ligação terminal, envolve a necessidade da reorientação espacial de um grupo muito volumoso, durante a formação do carbocâtion intermediário. Foi demonstrado que a velocidade de hidrólise de metil glicosídeos é diminuída pela introdução de grupos volumosos na molécula. No entanto, não há evidência experimental direta que comprove esta hipótese em polissacarídeos, embora SIMHA¹⁰⁴ tenha sugerido que os mono e oligossacarídeos, primeiramente formados na hidrólise ácida de polissacarídeos, sejam originados de ligações glicosídicas próximas ao término da cadeia.

Por outro lado, vários modelos teóricos, propostos para introduzir o conceito de uma hidrólise ao acaso para polissacarídeos, não tem encontrado respaldo experimental. Assim, quando a quantidade teórica (calculada) de D-glucose e de oligossacarídeos, liberados pela hidrólise de uma amostra conhecida de amido ou celulose, é comparada com a quantidade realmente formada, foi observado que, para quaisquer condições, o percentual de produtos de baixo grau de polimerização era superior àquele esperado para uma hidrólise completamente ao acaso¹⁵. Da mesma forma, na hidrólise do amido catalisada por resinas trocadoras de íons, o primeiro produto formado foi a D-glucose⁷².

Foi observado, por alguns pesquisadores, que a constante de velocidade para a hidrólise ácida da amilose aumenta com o tempo de reação, até atingir valores característicos para a hidrólise de dissacarídeos, como a maltose. Este fenômeno foi interpretado como um provável e gradativo aumento do número de terminais não redutores, devido a menor velocidade de hidrólise das ligações glicosídicas internas¹⁵.

Em resumo, a hidrólise ácida de polissacarídeos é afetada por vários fatores como: a configuração, o tamanho do anel e a conformação das unidades monossacarídicas constituintes; o tipo da ligação glicosídica; a presença de grupos funcionais (substituintes) na molécula e a intensidade de interações intra e inter-moleculares¹⁵. Não serão discutidas as influências de aspectos físicos da hidrólise ácida (temperatura, pressão e tempo de reação) com relação a estes mecanismos.

A investigação da influência de apenas um destes fatores sobre o comportamento de um polissacarídeo, em solução ácida diluída, é praticamente impossível. Estes fatores estão intimamente relacionados e não podem ser estudados isoladamente. Assim, qualquer alteração sobre a estrutura de um polissacarídeo, quer seja química ou física, acarretará mudanças na conformação e/ou na intensidade das interações moleculares, mascarando os efeitos esperados sobre a cinética de hidrólise do polímero devido àquela alteração.

Os parâmetros cinéticos investigados para a hidrólise ácida de metil glicosídeos não se adaptam completamente à hidrólise de polissacarídeos. Portanto as condições ótimas de hidrólise ácida (curva de hidrólise) deverão ser estabelecidas para cada polissacarídeo investigado.

11. METODOLOGIA UTILIZADA NA ANÁLISE DE POLISSACARÍDEOS COM ALGUMAS SEMELHANÇAS ESTRUTURAIS À FRAÇÃO OP-I.

O polímero OP-I do molusco *M. paranaguensis* apresenta uma composição química diferenciada dos demais polímeros descritos na literatura. Embora não se possa relacioná-la estruturalmente com nenhum dos polímeros conhecidos, algumas correlações, referentes à metodologia empregada, foram feitas com outros polímeros que apresentam composição química aproximada.

O polissacarídeo isolado de *Klebsiella* tipo K-63⁷⁴, por hidrólise ácida, demonstrou ser formado de fucose, galactose e ácido aldobiurônico. Sua estrutura foi em parte esclarecida pela análise dos produtos de hidrólise do polímero metilado, antes e após redução com hidreto de lítio e alumínio. O polímero per-*O*-metilado apresentou derivados de 2,4-di-*O*-metil-fucose e 2,4,6-tri-*O*-metil-galactose, numa relação molar de 1:2, enquanto que os componentes do polímero metilado e carboxi-reduzido apresentaram, em adição, o derivado de 2,4-di-*O*-metil-galactose. Deste modo, o ácido urônico foi identificado no polímero como ácido galacturônico, com substituição em 0-3.

O posicionamento das unidades de ácido urônico num polímero complexo (K-1), isolado de *Klebsiella* tipo 1 por ERBING *et al.*⁴⁷, foi estabelecido através de uma metodologia semelhante à descrita para o polímero de *Klebsiella* tipo K-63. O polímero K-1, formado por unidades de glucose, ácido urônico e aci

do pirúvico, numa relação molar de 1:1:1, foi carboxi-reduzido com boroidreto de sódio deuterado, usando *p*-toluenossulfonato de 1-ciclohexil-3-(2-morfolinoetil)carbodiimida como agente ativante. O polímero K-1 não reduzido apresentou os derivados 2,3,4-tri-*O*- e 2,3-di-*O*-metil-fucitol e o 2,3,4-tri-*O*-metil-glucitol como produtos da análise de metilação. Comparando-se estes resultados com os do polímero K-1 carboxi-reduzido, observou-se em adição o derivado deuterado 6^{*}-*O*-metil-glucitol (o asterisco indica a posição do deutério).

Porém, quando o polímero carboxi-reduzido foi previamente submetido à hidrólise ácida suave (ácido sulfúrico 5*M* por 30 minutos à 80°), seguida de metilação, apenas o derivado 2,3,6^{*}-tri-*O*-metil-glucitol foi comprovado como composto deuterado.

A interpretação destes dados foi consistente com substituição acetálica (ácido pirúvico) em *O*-2 e *O*-3 e com substituição glicosídica em *O*-4, nas unidades de ácido glucurônico.

Os estudos estruturais em polissacarídeos de *Klebsiella* demonstraram claramente as dificuldades encontradas no esclarecimento estrutural de polímeros contendo ácido urônico, principalmente quando estas unidades apresentam outros tipos de substituintes, como ocorre com o polímero K-1.

Mesmo utilizando uma metodologia refinada, semelhante à empregada nos polímeros de *Klebsiella* (exceto a marcação isotópica), não foi possível estabelecer o tipo de substituição do ácido urônico presente na fração OP-I. Tal polímero apresenta complicações adicionais, no que se refere a sua hidrólise ácida, devido ao alto teor em hexosaminas de que é constituído.

O processo de redução com hidreto de lítio e alumínio ,

combinado com a análise de metilação, não foi esclarecedor em virtude do insucesso na metilação do polímero OP-I não reduzido. Assim, dos derivados metilados apresentados na Tabela V, não é possível identificar que derivado originou-se das unidades de ácido urônico reduzidas.

Já a tentativa de carboxi-redução da fração OP-I com boridreto de sódio, utilizando cloridrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida como agente ativante¹⁰⁹, não apresentou o resultado esperado. Pois, não foram observadas diferenças apreciáveis na relação molar galactose/fucose, determinadas nos polímeros reduzidos e não reduzidos (Fig. 21). Este processo de redução exige um controle rígido de pH, nas etapas de ativação (pH 4,75) e de redução (pH 7), o que não pode ser realizado eficientemente, em virtude da pequena disponibilidade da amostra.

Todavia, estes resultados surpreendentes não invalidam o caráter ácido da molécula, evidenciado por ressonância magnética nuclear de carbono-13, pelo seu equivalente de neutralização e por dados cromatográficos e eletroforéticos já discutidos.

Apesar disto, há evidências, nas análises por r.m.n.-¹³C da fração OP-I, de que o ácido urônico encontra-se substituído em O-3 por uma unidade ainda não identificada.

A maioria dos heteropolissacarídeos que contêm fucose, isolados de microorganismos, apresentam estas unidades distribuídas em cadeias laterais simples.

Dentro destas características se enquadram os polissacarídeos isolados dos fungos *Armillaria mellea*⁵⁵.

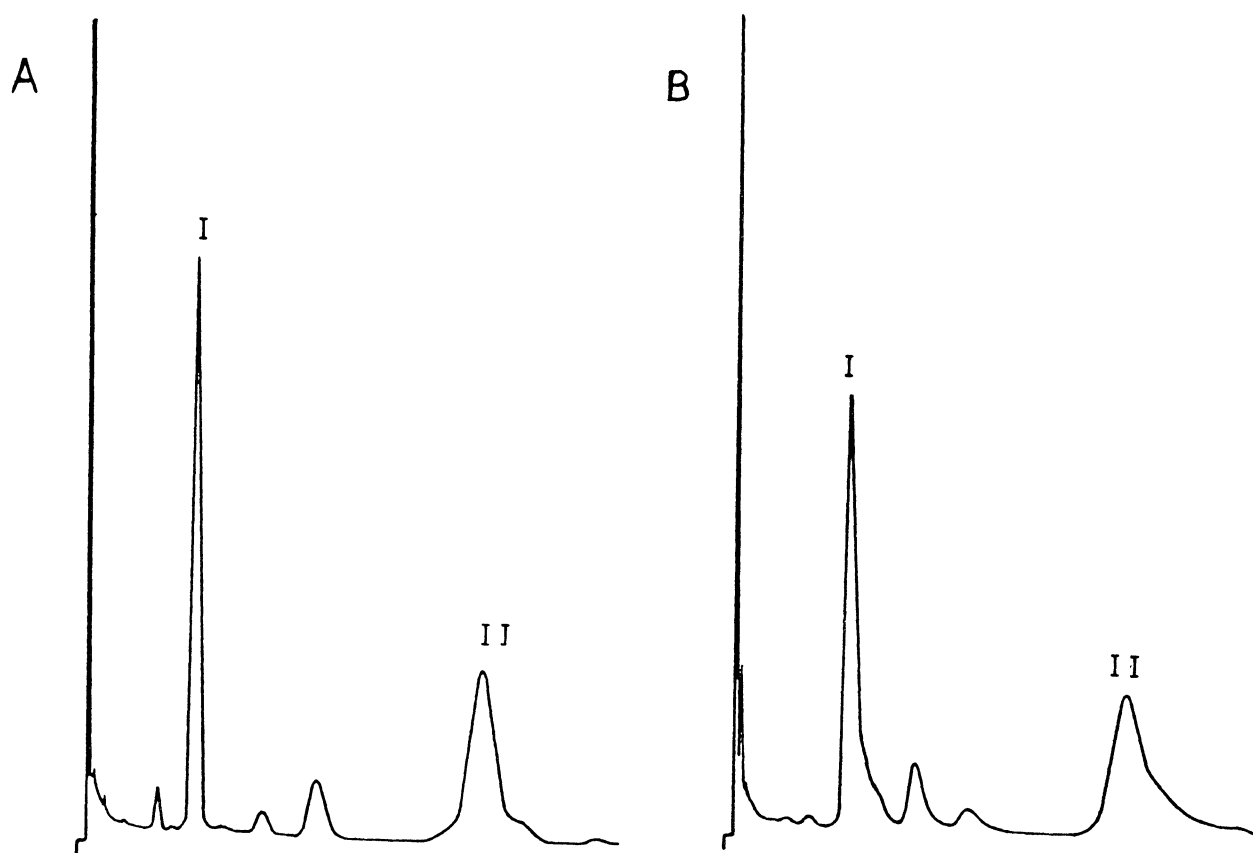


Fig. 21 - ANÁLISE POR c.f.g. (COLUNA CONVENCIONAL ECNSS-M, 120-180°, 40/MINUTO) DOS PRODUTOS DE HIDRÓLISE ÁCIDA (TFA 1M por 12 h a 100°) DA FRAÇÃO OP-I CARBOXI-REDUZIDA (DERIVADO DE CARBODIIMIDA), NA FORMA DE ACETATOS DE ALDITÓIS.

- A** - fração OP-I
- B** - fração OP-I carboxi-reduzida
- I - fucitol penta-O-acetato
- II - galactitol hexa-O-acetato

gênero *Polyporus* (*P. fomentarius* e *P. igniarius*)¹⁸. Análises de metilação, degradação de Smith e hidrólise ácida parcial demonstraram que o polímero de *A. mellea* é formado por uma cadeia principal de α -D-galactopiranoose, substituída em O-6, contendo cadeias laterais simples de L-fucopiranoose, ligadas em O-2 das unidades da cadeia principal. Este polímero também apresenta α -D-manopiranoose como grupo terminal não redutor de algumas cadeias laterais. Os polímeros de *P. fomentarius* e *P. igniarius* diferenciam-se do anterior por conter, em adição, D-galactopiranoose como grupo terminal não redutor.

Estes polímeros apresentam a particularidade de serem constituídos por unidades de galactose na configuração alfa, o que não foi ainda observado em polissacarídeos contendo galactose, isolados de moluscos. Embora não tenha sido feito um estudo detalhado sobre configuração anomérica, os dados de ressonância de carbono-13 da fração OP-I são consistentes com β -D-galactopiranoose.

DUTTON & MERRIFIELD⁴³, reinvestigando o polissacarídeo elaborado pela bactéria *Klebsiella* tipo K-54, demonstraram que o mesmo é constituído por uma unidade octassacarídica repetitiva, formada por fucose, ácido urônico e galactose, além de grupos formil e acetil. Apesar da estrutura deste polímero ter sido elucidada por diferentes métodos analíticos, serão discutidos com mais detalhe somente alguns aspectos estruturais relativos à análise por r.m.n.-¹³C.

A presença do derivado 2,3-di-O-metil-glucitol (acetato de alditol), observada apenas nos produtos de hidrólise ácida do polímero metilado e reduzido (hidreto de lítio e alumínio),

demonstrou que o ácido urônico apresentava substituição em 0-4, como ocorre com o polímero de *Klebsiella* tipo 1⁴⁷. A configuração anomérica deste ácido foi estabelecida por espectroscopia de r.m.n.-¹³C, atribuindo o sinal em δ 101,5 ao C-1 do ácido α -glucurônico.

O valor deste sinal (δ 101,5) está em concordância com aquele observado por GORIN & MAZUREK⁶³ para o C-1 (δ 100,7) do ácido metil α -D-glucopiranosidurônico, desde que o anômero beta correspondente apresenta um sinal de C-1 em campo mais baixo (δ 104,3).

Estes autores também assinalaram os sinais de δ 100,5 e δ 104,9 para os metil α - e metil β -D-galactopiranosídeos, respectivamente.

De acordo com estes dados, os sinais de δ 103, e 105,2, observados no polímero OP-I, são coincidentes com configuração beta, embora não se possa indicar com segurança que sinal pertence ao C-1 do ácido urônico. De qualquer forma, os dados eliminam a configuração alfa para as unidades de galactose e ácido urônico, constituintes do polímero OP-I.

O sinal em δ 100,2, atribuído à α -fucopiranose do polímero OP-I (substituída em 0-4), está em concordância com os estudos de r.m.n.-¹³C realizados em outros polímeros que contêm fucose.

No polímero de *Klebsiella* tipo K-54⁴³, o sinal em δ 99,8 foi atribuído à α -L-fucopiranose substituída em 0-3, enquanto que SHASHKOV *et al.*¹⁰³ assinalaram o valor de δ 100,1 à α -L-fucopiranose como grupo terminal não redutor de oligossacarídeos, isolados da substância H dos grupos sanguíneos.

SHASHKOV *et al.*¹⁰³ também investigaram, por r.m.n.-¹³C, as unidades de *N*-acetil-hexosaminas presentes na substância H dos grupos sanguíneos. Os sinais de δ 98,5 e δ 102,0 foram atribuídos ao C-1 da *N*-acetil-D-glucosamina, nas configurações alfa e beta piranosídicas, respectivamente.

Deste modo, o sinal em δ 97,2, presente no espectro de r.m.n.-¹³C da fração OP-I, é consistente com o C-1 das unidades de *N*-acetil- α -glucosamina, que neste polímero encontram-se em substituição em O-4 (2-amino-2-deoxi-glucopiranoose).

Os dados estruturais, obtidos para o heteropolímero OP-I, demonstraram pouca correlação com os polímeros isolados de glândula de albúmen e de massa de ovas de moluscos. Com poucas exceções, esses polímeros são homogalactanas ramificadas, que apresentam unidades de galactopiranoose substituídas em O-3 e O-6.^{67,96}

Heteropolissacarídeos ácidos contendo fucopiranoose (fucogalactana) foram observadas nos polímeros de *Ampullarius* sp. (Morretes, PR)⁴⁸ e de *Marisa cornuarietis*³⁴, enquanto que um heteropolímero contendo glucopiranoose foi isolado de *Ampullarius* sp. (Pelotas, RS) por FEIJÓ & DUARTE (glucogalactana)⁴⁹.

O polímero OP-I apresenta uma estreita correlação com a *Ampullarius* sp (Morretes, PR), no que concerne à substituição em O-2. Este tipo de polissacarídeos isolados de espécies de moluscos da família Helicidae²¹. Outros polímeros investigados em moluscos do gênero *Ampullarius* não apresentava tal tipo de ligação.

A presença de galactopiranoose substituída em O-2 na fração OP-I de *M. paranaguensis* e na fucogalactana de *Ampullarius* sp.

(Morretes,PR) demonstra que este tipo de ligação não é exclusivo de polímero isolado de espécies de moluscos da família *Helicidae*.

12. REAÇÕES DE AGLUTINAÇÃO ESPECÍFICAS ENTRE LECTINAS E A FRAÇÃO OP-pH 7.

A especificidade observada na interação entre lectinas e carboidratos tem sido útil na elucidação de certos aspectos estruturais de oligo e polissacarídeos. Por isso, o polissacarídeo isolado de oviduto-próstata de *M. paranaguensis* (OP-pH 7) foi testado por um sistema de lectinas, específicas para unidades de L-fucopirranose e D-galactopirranose. A fração OP-I será investigada pelo mesmo sistema, após o estabelecimento definitivo de sua estrutura fina.

Realmente, as lectinas são macromoléculas de natureza proteica ou glicoproteica, que apresentam a propriedade de ligar-se não covalentemente a carboidrato(s). Estes carboidratos podem estar livres, situados em superfícies de células, ligados a glicoproteínas ou como grupos terminais não redutores de polissacarídeos.

Desta associação lectina-carboidrato(s) resultam todas as propriedades atribuídas às lectinas, como: **a)** aglutinação de células; **b)** precipitação de polissacarídeos e glicoproteínas, **c)** reconhecimento de carboidratos em estruturas complexas.

A interação entre lectinas e carboidrato(s) podem ser específica para: **a)** configuração; **b)** anomericidade; **c)** tipo de ligação; **d)** conformação do carboidrato. Esta interação ocorre porque a lectina apresenta um sítio de ligação específico para carboidrato(s), do qual depende as propriedades acima rela

cionadas.

Embora algumas lectinas tenham sido caracterizadas como glicoproteínas, com teores em carboidratos tão altos quanto 50% observado na glicoproteína isolada da batata ², a porção de carboidratos ligado covalentemente à macromolécula provavelmente não contribui para a atividade lectínica. Sua importância é relativa apenas à estabilidade da macromolécula.

Realmente, este fato é corroborado por três lectinas isoladas da esponja *Aaptos papillata* ²³, pela aglutinina do amendoim ⁸⁰ e pela concanavalina A ¹ que são destituídas de açúcares ligados covalentemente.

Com base na especificidade das lectinas por carboidratos, GOLDSTEIN & HAYES ⁶⁰ apresentaram um esquema que representa as unidades reconhecidas por diversas lectinas, numa estrutura hipotética de uma substância específica de grupo sanguíneo humano (Esquema D). Esta estrutura apresenta algumas correlações com a composição química da fração polissacarídica em estudo, exceto no que concerne à presença de ácido urônico e grupos sulfato.

A fração polissacarídica ácida isolada de oviduto-próstata de *M. paranaguensis* foi gentilmente testada pelo Professor Uhlenbruck (Colônia, Alemanha), utilizando lectinas específicas para a L-fucopirranose e para a D-galactopirranose.

Foram utilizadas as lectinas isoladas da esponja *Geodia cynodium* e da espécie de ostra *Tridacna gigas*, específicas para o reconhecimento de D-galactose como grupo terminal não redutor em polissacarídeos. A reação precipitação *in vitro* da fra

ção OP-pH 7 foi positiva com ambas as lectinas, sugerindo que tais unidades realmente se encontrem como terminais não redutores do polímero e que apresentem configuração absoluta D. De fato, os dados de metilação demonstraram que o polímero apresenta unidades de galactose nesta posição.

Uma lectina isolada de *T. maxima*⁶⁰ apresentou atividade semelhante à da *T. gigas*, no que se refere à precipitação de β -D-galactopiranas de várias origens (*Helix pomatia*, *Limnaea stagnalis*, *Larix occidentalis* e o polissacarídeo de *Pneumococcus* tipo XIV). A lectina de *T. maxima* também apresentou atividade com β -D-galactopiranas com substituição em O-6⁶⁰, indicando que provavelmente esta atividade seja comum às lectinas isoladas de espécies do gênero *Tridacna*. Estas lectinas não apresentam atividade para oligossacarídeos que contenham unidades de α -D-galactopiranoose, eliminando desta forma tal configuração no polímero investigado.

Entretanto, quando a fração OP-pH 7 foi testada com lectinas isoladas de soro de enguia, *Anguilla anguilla* e com lectinas de sementes das plantas leguminosas, *Lotus tetragonolobus* e *Ulex europaeus* I, nenhuma precipitação foi observada.

É conhecido que as lectinas de *A. anguilla*, *L. tetragonolobus* e *U. europaeus* I são específicas para α -L-fucopiranosídeos e para α -L-fucopiranosil, presente como grupo terminal não redutor em polissacarídeos. Entretanto, essas lectinas não apresentam nenhuma atividade para unidades de D-fucopiranoose e D-galactopiranoose⁶⁰.

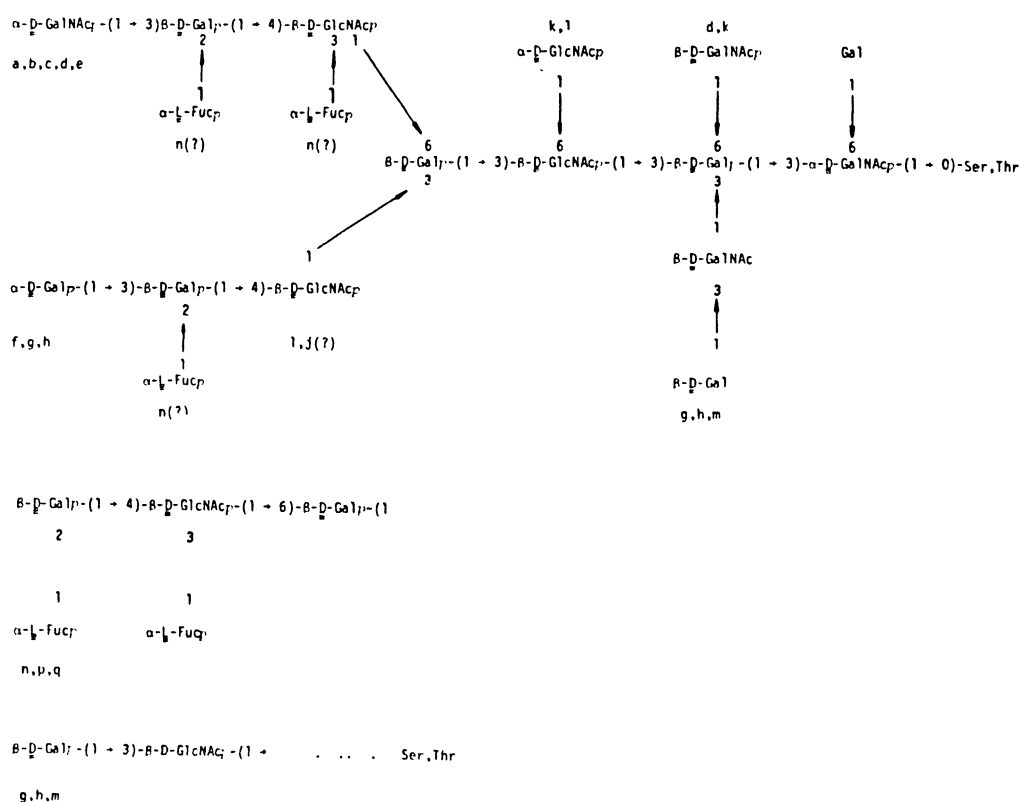
A não reatividade entre a fração OP-pH 7 e as lectinas específicas para unidades de fucose, está em concordância com

a análise de metilação, cujos dados indicaram que estas unidades, inequivocamente presentes no polímero, encontram-se dispostas internamente com substituição em 0-4.

Em virtude da especificidade para polímeros contendo D-galactose como grupo terminal não redutor das lectinas utilizadas (*T. gigas* e *G. cynodiu*m), estes estudos imunoquímicos são indicativos do enantiômetro D no polímero OP-pH 7, embora não excluam a presença concomitante de L-galactose.

ESQUEMA D

REPRESENTAÇÃO DOS LOCI ESPECÍFICOS PARA ALGUMAS LECTINAS EM SUBSTÂNCIAS ESPECÍFICAS DOS GRUPOS SANGÜÍNEOS (ESTRUTURA HIPOTÉTICA).



a. *Dolichos biflorus*; b. *Phaseolus lunatus*; c. *Helix pomatia*; d. *Glycine max*; e. *Bandeiraca simplicifolia* I (A₄); f. *Bandeiraca simplicifolia* I (B₄); g. *Abrus precatorius*; h. *Sophora japonica*; i. *Triticum vulgare*; j. *Cytisus sessilifolius*; k. *Canavalia ensiformis*; l. *Bandeiraca simplicifolia* II; m. *Ricinus communis*; n. *Ulex europaeus*; o. *Arachis hypogaea*; p. *Lotus tetragonolobus*; q. *Anguilla anguilla*; e r. *Vicia graminea*.

IV. APÊNDICE

O *Megalobulimus paranaguensis* é um Gastropoda terrestre e hermafrodita, bastante abundante no litoral paranaense.

Sendo uma espécie de molusco de grande porte, permite a dissecação de certos órgãos do aparelho reprodutivo, dificilmente obtidos em moluscos de pequeno porte.

De um modo geral, o sistema reprodutivo de moluscos hermafroditas pode ser dividido em: (a) órgãos hermafrodíticos ; (b) genitália masculina; (c) genitália feminina.

Estudos histológicos²⁷, efetuados em *Biomphalaria glabrata* (anteriormente *Australorbis glabratus*), demonstraram que os órgãos hermafrodíticos compreendem o ovotestis, seu canal coletor e o duto hermafrodítico. A genitália masculina consiste da glândula prostática e do trato genital (ducto espermático, vaso deferente e complexo penial), enquanto que a genitália feminina é uma região mais complexa, que inclui a glândula de al^ub^umen, o carrefour, o oviduto, a glândula nidamental, o útero, o receptáculo seminal e a vagina. O carrefour, o oviduto, a glândula nidamental, o útero e a vagina formam um ducto contínuo, que conduz a ova madura ao exterior.

A região anatômica do molusco *M. paranaguensis* selecionada para estudo, compreendeu principalmente o oviduto-próstata.

Um estudo histológico deverá ser feito posteriormente , para comprovar a natureza histológica da preparação.

Esta região anatômica compreende órgãos pertencentes às genitálias feminina e masculina, respectivamente, os quais são anatomicamente interrelacionados e de difícil dissecação. Por este motivo, a investigação do conteúdo em carboidratos destes órgãos, isoladamente, foi realizado apenas em um número reduzido de exemplares.

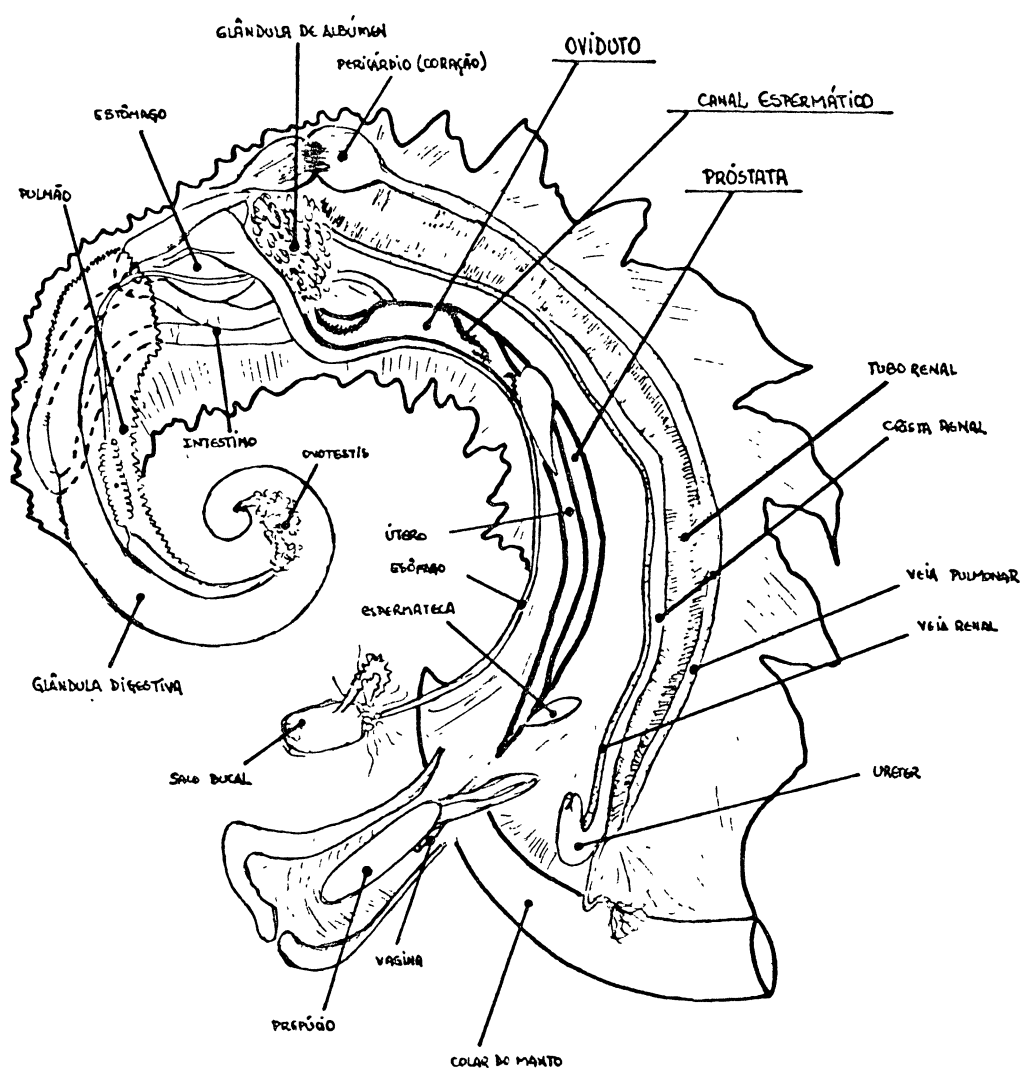


Fig. 22 - LOCALIZAÇÃO ANATÔMICA DO OVIDUTO-PRÓSTATA.

V. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AGRAWAL, B.B.L. & GOLDSTEIN, I.J. Specific binding of concanavalin A to cross-linked dextran gels. Biochem.J., 96:23c-25c, 1965.
2. ALLEN, A.K. & NEUBERGER, A. The purification and properties of the lectin in potato tubers, a hydroxy proline-containing glycoprotein. Biochem.J., 135: 307-14, 1973.
3. AMINOFF, D. & MORGAN, W.T.J. Hexosamine components of the human blood group substances. Nature, 162: 579-80, 1948.
4. ANDERSON, N.S.; DOLAN, T.C.S.; LAWSON, C.J.; PENMAN, A.; REES, D.A. Carragenans. Part V. The masked repeating structures of λ e μ -carragenans. Carbohydr. Res., 7:468-73, 1968.
5. ANDERSON, N.S.; DOLAN, T.C.S.; REES, D.A. Carragenans. Part VII. Polysaccharides from *Euchema spinosum* e *Euchema cottonii*. The covalent structure of ι -carragenan. J.Chem.Soc. Perkin Trans. I, 2173-6, 1973.
6. ANTONOPOULOS, C.A. A modification for the determination of sulphates in mucopolysaccharides by the benzidine method. Acta Chem.Scand., 16:1521-2, 1962.
7. ARMOUR, C.; BUNTON, C.A.; PATAI, S.; SELMAN, L.H.; VERNON, C.A. Mechanism of reaction in the sugar seri

- es. III. Acid-catalysed hydrolysis of *tert*-butyl β -D-glucopyranoside and other glycosides. J.Chem.Soc., 412-6, 1961. Chem.Abstr., 56:14382c, 1962.
8. ARMSTRONG, H.E. & GLOVER, W.H. Studies on enzyme action. XI. Hydrolysis of raffinose by acids and enzymes. Proc.Roy.Soc.(London), Ser.B, 80:312-21, 1908. Chem.Abstr., 2:3107, 1908.
 9. ASPINALL, G.O. Reduction of uronic acids in polysaccharides. Methods Carbohydr.Chem., 5:397-400, 1965.
 10. BAKER, S.A. & SOMERS, P.J. A spectrophotometric method for the determination of formic acid on the periodate oxidation of carbohydrates. Carbohydr.Res., 3:220-31, 1955.
 11. BAMFORD, C.; CAPON, B.; OVEREND, W.E. Reactions at position 1 of carbohydrates. IV. Kinetics and mechanism of the acid-catalysed hydrolysis of ethyl and phenyl 1-thio- β -D-glucopyranoside. J.Chem.Soc., 5138-41, 1962. Chem.Abstr., 58:3500d, 1963.
 12. BANKS, B.E.C.; MEINWALD, Y.; RHID-TUTT, A.J.; SHEFT, I.; VERNON, C.A. Mechanisms of reaction in the sugar series. IV. The structure of the carbonium ions formed in the acid-catalysed solvolysis of glycopyranosides. J.Chem.Soc., 3240, 1961. Chem.Abstr., 56:14382f, 1962.
 13. BARTLETT, G.R. Phosphorus assay in column chromatography. J.Biol.Chem., 234:466-8, 1959.
 14. BELL, D.J. & BALDWIN, E. The chemistry of galactogen from *Helix pomatia*. L-Galactose as a component of a polysaccharide of animal origin. J.Chem.Soc., 125-32, 1941.

15. BeMILLER, J.N. Acid-catalysed hydrolysis of glycosides. Adv. Carbohydr. Chem., 22:25-108, 1967.
16. BERGMAYER, H.U. & BERNT, E. Lactate dehydrogenase. Ultra violet test with pyruvate and NADH. Methoden Enzym. Anal., 3. Neubearbeitete Erweiterte Aufl., 1:607-12, 1974. Chem. Abstr., 82:27579a, 1975.
17. BITTER, T. & MUIR, H.M. A modified uronic acid carbazole reaction. Anal. Biochem., 4:330-4, 1962.
18. BJÖRNDAL, H. & LINDBERG, B. Polysaccharides elaborated by *Polyporus fomentarius* (Fr.) e *Polyporus igniarius* (Fr.). Part I. Water-soluble neutral polysaccharides from the fruit bodies. Carbohydr. Res., 10: 79-85, 1969.
19. BLIX, G. The determination of hexosamines according to Elson and Morgan. Acta Chem. Scand., 2:467-73, 1948.
20. BOAS, N.F. Method for the determination of hexosamines in tissues. J. Biol. Chem., 204:553-63, 1953.
21. BRETTING, H.; JACOBS, G.; BENECKE, I.; KÖNIG, W.A.; THIEM, J. The occurrence of L-galactose in snail galactans. Carbohydr. Res., 139:225-36, 1985.
22. BRETTING, H.; JACOBS, G.; THIEM, J.; KÖNIG, W.A.; VAN DER KNAAP, W. Structural investigations of the galactan of the snail *Lymnaea stagnalis*. Carbohydr. Res., 145:201-18, 1986.
23. BRETTING, H.; KABAT, E.A.; LIAO, J.; PEREIRA, M.E.A. Purification and characterization of the agglutinins from the sponge *Aaptos papillata* and a study of their combining sites. Biochemistry, 15:5029-38, 1978.

24. BUNTON,C.A.; LEWIS,T.A.; LLEWELLYN,D.R.; VERNON,C.A.
Mechanisms of reaction in the sugar series. Part
I. The acid-catalysed hydrolysis of α - and β -me-
thyl and α - and β -phenyl D-glucopyranosides. J.
Chem.Soc., 4419-23, 1955.
25. CAPON,B. & THACKER,D. Nucleophilic assistance in
the acid-catalysed reactions of acetals and gly-
cosides. J.Amer,Chem.Soc., 87:4199-200, 1965.
26. CHEN,P.S.; TORIBARA,T.Y.; WARNER,H. Microdetermina-
tion of phosphorus. Anal,Chem., 28:1756-8, 1956.
27. CHIA-TUNG PAN. The general histology and topogra-
phic microanatomy of *Australorbis glabratus*. Bull.
Mus.Comp.Zool., 119 (3):237-99, 1958.
28. Comunicação pessoal.
29. DAWSON,R.M.C.; ELLIOTT,D.C.; ELLIOTT,W.H.; JONES,K.M.
Data for biochemical research. Oxford, Clarendon
Press, 1969, 29 ed. p.541-2.
30. DEMAINE,A.L. & PHAFF,H.J. The preparation of tetraga-
lacturonic acid. Arch.Biochem.Biophys., 51: 114-
21, 1954.
31. DIETRICH,C.P.; PAIVA,J.F.; MORAES,C.T.; TAKAHASHI,H.
K.; PORCIONATTO,M.A.; NADER,H.B. Isolation and
characterization of a heparin with high anticoagu-
lant activity from *Anomalocardia brasiliiana*. Bioch.
Biophys.Acta, 843:1-7,1985.
32. DISCHE,Z. Color reaction of pentoses. Methods Carbo
hydr.Chem., 1:484-8, 1962.

33. DMITRIEV,B.A.; KNIREL,Y.A.; KOCHETKOV,N.K.; HOFMAN,I. L. Selective cleavage of glycosidic linkage: studies with the polysaccharide component of *Shigella dysenteriae* type 6 lipopolysaccharide. Carbohydr. Res., 44:77-85, 1975.
34. DUARTE,H.S. Determinação da configuração de acetal de ácido pirúvico em polissacarídeo do molusco *Pomacea lineata* (SPIX, 1827). Curitiba, 1983. 158 p. Tese, Mestrado, Universidade Federal do Paraná.
35. DUARTE,J.H. Estudos estruturais sobre galactanas de moluscos. Curitiba, 1985. 104 p. Tese, Professor Titular, Universidade Federal do Paraná.
36. DUARTE,J.H. & JONES,J.K.N. Some structural studies on the galactan from the albumen glands of the snail *Strophocheilus oblongus*. Carbohydr. Res., 16:327-35, 1971.
37. DUARTE,J.H. & MORETTO,M.I. Polissacarídeos isolados do oviducto de *Strophocheilus oblongus*. Arq.Biol.Tecnol., 14 (1):62, 1971.
38. DUARTE,J.H.; RAMOS,L.P.; UHLENBRUCK,G.; FONTANA,J.D.; IACOMINI,M.; GORIN,P.A.J. Structural and immunological features on the fucogalactan from spermoviduct-prostate of the snail *Megalobulimus paranaguensis*. Arq.Biol.Tecnol., 27 (2):152, 1984.
39. DUBOIS,M.; GILLES,K.A.; HAMILTON,J.K.; REBERS,P.A.; SMITH,F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Anal.Chem., 28:350-6, 1956.
40. DUCKWORTH,M. & YAPHE,W. Definitive assay for pyruvic acid in agar and other algal polysaccharides. Chem. Ind., 6:747-8, 1970.

41. _____. The structure of agar. Part I. Fraction of a complex mixture of polysaccharides. Carbohydr. Res., 16:189-97, 1971.
42. _____. The structure of agar. Part III. Pyruvic acid, a common feature of agars from different agarophytes. Carbohydr. Res., 16:446-8, 1971.
43. DUTTON, G.G.S. & MERRIFIELD, E.H. The capsular polysaccharide from *Klebsiella* serotype K54; location of the *O*-acyl groups, and a revised structure. Carbohydr. Res., 105:189-203, 1982.
44. EASTY, D.B. Synthesis and acid hydrolysis of methyl α -D-glucopyranosiduronic acid. J. Org. Chem., 27:2102-6, 1962. Chem. Abstr., 57:4746a, 1962.
45. EDWARD, J.T. Stability of glycosides to acid hydrolysis. A conformational analysis. Chem. Ind. (London), 1102-4, 1955.
46. ELSON, L.A. & MORGAN, W.T.J. A colorimetric method for the determination of glucosamine and chondrosamine. Biochem. J., 27:1824-8, 1933.
47. ERBING, C.; KENNE, L.; LINDBERG, B.; LÖNNGREN, J.; SUTHERLAND, I.W. Structural studies of the capsular polysaccharide from *Klebsiella* type 1. Carbohydr. Res., 50:115-20, 1976.
48. FEIJÓ, M.A.L. & DUARTE, J.H. Some structural studies on the fucogalactan from egg masses of the snail *Ampullarius* sp.. Carbohydr. Res., 44:241-9, 1975.
49. FEIJÓ, M.A.L.; DUARTE, J.H.; MACKENZIE, S.L.; GORIN, P. A.J. Structure and biodegradation of the polysaccharide components of egg masses isolated from snails of an *Ampullarius* species. Carbohydr. Res., 111:105-12, 1982.

50. FERREIRA, T.M.P.C.; CHAVANTES, S.F.; DIETRICH, C.P.; NADER, H.B. Heparan sulfate in molluscs: evidence for structural maintenance through evolution. Arq. Biol.Tecnol., 29 (1):78, 1986.
51. FERRIER, R.J. & COLLINS, P.M. Monosaccharide chemistry. New York, Penguin, 1972. 218 p.
52. FLOWERS, H.M. Chemistry and biochemistry of D- and L-fucose. Adv.Carbohydr.Chem.Biochem., 39:279-345, 1981.
53. FONTANA, J.D.; DUARTE, J.H.; GALLO, C.B.H.; IACOMINI, M.; GORIN, P.A.J. Occurrence of β -D-galactopyranosyl units esterified at O-6 with 2-aminoethylphosphonic acid in the D-galactan of albumen glands of the snail *Megalobulimus paranaguensis*. Carbohydr.Res., 143:175-83, 1985.
54. FOSTER, A.B. & STACEY, M. The chemistry of the 2-amino sugars (2-amino-2-deoxy-sugars). Adv.Carbohydr.Chem., 7:247-88, 1952.
55. FRASER, R.N. & LINDBERG, B. Polysaccharides elaborated by *Armillaria mellea* (Tricholomataceae). Part I. A water soluble polysaccharide from the fruit bodies. Carbohydr.Res., 4:12-9, 1967.
56. GAILLARD, B.D.E. Use of unneutralized hydrolysates in paper chromatography of sugars. Nature, 171:1160, 1953.
57. GARDELL, S. Determination of hexosamines. Methods Anal.Biochem., 6:289-317, 1958.
58. _____. Separation on Dowex-50 ion exchange resin of glucosamine and galactosamine and their quantitative determination. Acta Chem.Scand., 7:207-15, 1953.

59. GAREGG, P.J.; JANSSON, P.E.; LINDBERG, B.; LINDH, F.; LÖNNGREN, J.; KVARNSTROM, I.; NIMMICH, W. Configuration of the acetal carbon atom of pyruvic acid acetals in some bacterial polysaccharides. Carbohydr.Res., 78:127-32, 1980.
60. GOLDSTEIN, I.J. & HAYES, C.E. The lectins: carbohydrate-binding proteins of plants and animals. Adv. Carbohydr.Chem., 35:127-348, 1978.
61. GORIN, P.A.J. Carbon-13 nuclear magnetic resonance spectroscopy of polysaccharides. Adv.Carbohydr. Chem.Biochem., 38:13-104, 1981.
62. GORIN, P.A.J.; ISHIKAWA, T.; SPENCER, J.T.; SLONEKER, J.H. Configuration of the pyruvic acid ketals, 4,6-O-linked to D-glucose units, in *Xanthomonas campestris* polysaccharide. Can.J.Chem., 45:2005-8, 1967.
63. GORIN, P.A.J. & MAZUREK, M. Further studies on the assignment of signals in ¹³C-magnetic resonance spectra of aldoses and derived methyl glycosides. Can.J. Chem., 53:1212-23, 1975.
64. GORIN, P.A.J. & SPENCER, J.T. Structure of the extracellular polysaccharides from *Corynebacterium insidiosum*. Carbohydr.Res., 79:313-5, 1980.
65. GORIN, P.A.J.; SPENCER, J.T.; FINLAYSON, A.J. Occurrence of (2-acetamido-2-deoxygluco)mannans in the cells of certain yeasts. Carbohydr.Res., 16:161-6, 1971.
66. HAUG, A. & LARSEN, B. Separation of uronic acid by paper electrophoresis. Acta Chem.Scand., 15(6):1395-6, 1961.
67. HAWORTH, W.N. A new method of preparing alkylated sugars. J.Chem.Soc., 107:8-16, 1915.

68. HESTRIN, S. The reaction of acetylcholine and other carboxilic acid derivatives with hydroxylamine, and its analytical application. J.Biol.Chem., 180:249-61, 1949.
69. HOUGH, L.; JONES, J.K.N.; WADMAN, W.H. Quantitative analysis of mixtures of sugars by the method of partition chromatography. Part V. Improved method for the separation and detection of the sugars and their methylated derivatives on paper chromatogram. J.Chem.Soc., 1702-6, 1950.
70. IACOMINI, M.; DUARTE, G.R.; DUARTE, E.R.; DUARTE, H.S.; FONTANA, J.D.; DUARTE, J.H. Structural study on snail galactans from the genus *Biomphalaria*. Agric. Biol.Chem., 45 (6):1373-80, 1981.
71. IACOMINI, M.; DUARTE, G.R.; MORETTO, M.I.; DUARTE, J.H. Fucogalactano isolado do oviduto de *Vaginulus* sp. e *Megalobulimus paranaguensis*. In: Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica, 7., Caxambú, abr. 19-22, 1978. Anais. Curitiba, Instituto de Biologia e Tecnologia do Paraná, 1978, 150 p.
72. IVANCENKO, D.; ZAJAC, P.; KOURIL, P. Starch hydrolysis with ion exchangers. Sb.Prac.Chem.Fak.SVST (Sloven.Vysokej.Skoly Tech.), 135-43, 1962. Chem.Abstr., 59:10333e, 1963.
73. JANSSON, P.; KENNE, L.; LIEDGREN, H.; LINDBERG, B.; LÖNNGREN, J. A practical guide to the methylation analysis of carbohydrates. Chem.Comm., (8):1-70, 1976.
74. JOSELEAU, J.P. & MARAIS, M.F. Structure of the capsular polysaccharide of *Klebsiella* K-type 63. Carbohydr.Res., 77:183-90, 1979.

75. KUHN,R.; TRISCHMANN,H.; LÖW,I. Zur Permethylierung von zuckern and glikosiden. Angew.Chem., 67(1):32, 1955.
76. LEONTEIN,K.; LINDBERG,B.; LÖNNGREN ,J. Assignment of absolute configuration of sugar by g.l.c. of their acetylated glycosides formed from chiral alcohols. Carbohydr.Res., 62:359-67, 1978.
77. LINKER,A. & HOVINGH,P. The heparitin sulfates (heparan sulfates). Carbohydr.Res., 29:41-62, 1973.
78. LONG,F.A.; PRITCHARD,J.G.; STAFFORD,F.E. Entropies of activation and mechanism for the acid-catalysed hydrolysis of ethylene oxide and its derivatives. J. Amer.Chem.Soc., 79:2362-4, 1957.
79. LÖNNGREN,J. & SVENSSON,S. Mass spectrometry in structural analysis of natural carbohydrates. Adv.Carbohydr.Chem., 29:41-106, 1974.
80. LOTAN,R.; SKUTELSKY,E.; DANON,D.; SHARON,N. The purification, composition and specificity of the anti-T lectin from peanut (*Arachis hypogaea*). J.Biol.Chem., 250:8518-23, 1975.
81. LOWRY,O.H.; ROSEBROUGH,N.J.; FARR,A.L.; RANDALL,R.L. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J.Biol.Chem., 193:265-75, 1951.
82. LUDOWIEG,J. & DORFMAN,A. A micromethod for the colorimetric determination of *N*-acetyl groups in acid mucopolysaccharides. Biochim.Biophys.Acta, 38:212-8, 1960.
83. MARCHESSAULT,R.H. & RANBY,B.G. Hydrolysis of cellulose in phosphoric acid solution - inductive effects. Svensk.Papperstidn., 62:230-40, 1959. Chem.Abstr., 53:22910i, 1959.

- 83a. MAY, F. & WEINLAND, H. The acid hydrolysis of galactogens. II. Isolation and identification of disaccharides present, 3- β -D-galactosido-D-galactose and 6- β -D-galactosido-D-galactose and a trace of 6- α -L-galactosido-D-galactose. Z.Physiol.Chem., 305:87-96, 1956.
84. McCOMB, E.A. & McCREADY, R.M. Determination of acetyl in pectin and acetylated carbohydrate polymers. Hydroxamic acid reaction. Anal.Chem., 29:819-21, 1957.
85. MORGAN, W.T.J. & ELSON, L.A. A colorimetric method for determination of N-acetylglucosamine and N-acetylchondrosamine. Biochem.J., 28:988-95, 1935.
86. MUKERJEE, H. & SRI RAM, J. A new solvent system for paper chromatography separation of glucuronic and galacturonic acids. J.Chromatogr., 14:551-2, 1964.
87. NADER, H.B.; JERONIMO, S.M.B.; PORCIONATTO, M.A.; DIETRICH, C.P. Biosynthesis of an acidic galactan and sulfated glycosaminoglycans during embryonic development of the mollusc *Pomacea* sp.. Biochim.Biophys. Acta, 840:187-92, 1985.
88. NASH, R.L. The colorimetric estimation of formaldehyde by means of the Hantzsch reaction. Biochem.J., 55:416-21, 1953.
89. NATH, R.L. & RYDON, H.N. The influence of structure on the hydrolysis of substituted phenyl β -D-glucosides by emulsin. Biochem.J., 57:1-10, 1954.
90. NEUMÜLLER, G. & VASSEUR, E. The influence of pH on the periodate oxidation of carbohydrates. Arkiv. för Kemi, 5 (21):235-45, 1953.

91. OVEREND, W.G.; REES, C.W.; SEQUEIRA, J.S. Reaction at position 1 of carbohydrates. Part III. The acid - catalysed hydrolysis of glycosides. J.Chem.Soc., 3429-40, 1962.
92. PAIVA, J.F.; SANTOS, E.A.; NADER, H.B.; DIETRICH, C.P. Heparin in molluscs: isolation and partial characterization of heparins from *Tivela mactroides* and *Donna striatus*. Arq.Biol.Tecnol., 29 (1):78 , 1986.
93. PENMAN, A. & REES, D.A. Carragenans. Part X. Synthesis of 3,6-di-O-methyl-D-galactose, a new sugar from the methylation analysis of polysaccharides related to ξ -carragenan. J.Chem.Soc.Perkin Trans I, 2188-91, 1973.
94. PONTAROLO, R. Estudo de polissacarídeos de placenta bovina em diferentes estágios de gestação. Curitiba, 1986. 56 p. Tese, Mestrado, Universidade Federal do Paraná.
95. RAMOS, L.P.; DUARTE, J.H.; DUARTE, M.E.R.; FONTANA, J.D.; GORIN, P.A.J. Lightly sulfated heteropolysaccharide from the spermoviduct-prostate of the snail *Megalobulimus paranaguensis*. Arq.Biol.Tecnol., 29 (1):75, 1986.
96. RAMOS, L.P.; DUARTE, J.H.; GORIN, P.A.J. Structural determinations on a heteropolysaccharide isolated from the spermoviduct-prostate region of the snail *Megalobulimus paranaguensis*. Arq.Biol.Tecnol., 28 (1):85, 1985.
97. RANBY, B.G. & MARCHESSAULT, R.H. Inductive effects in the hydrolysis of cellulose chains. J.Polymer Sci, 36 : 561-4, 1959. Chem.Abstr., 53:17501b, 1959.

98. SAWARDEKER, J.S.; SLONEKER, J.H.; JEANES, A. Quantitative determination of monosaccharide as their alditol acetates by gas liquid chromatography. Anal. Chem., 37:1602-4, 1965.
99. SCHMIT, J.C.; EDSON, C.M.; BRODY, S. Changes in glucosamine and galactosamine levels during conidial germination in *Neurospora crassa*. J. Bacteriol., 122 (3):1062-70, 1975.
100. SEGURA, E.A.D. & DUARTE, J.H. Methylation studies of the polysaccharide resulting from sequential Smith-degradations of the galactan from the snail *Strophocheilus oblongus*. Carbohydr. Res., 52:159-67, 1976.
101. SEN, A.K. & MUKHERJEE, A.K. Structural studies of a specific polysaccharide isolated from nonagglutinable *Vibrio*. Carbohydr. Res., 64:215-23, 1978.
102. SHARON, N. Complex carbohydrates. Their chemistry, biosynthesis, and function. New York, Addison-Wesley, 1975. 466 p.
103. SHASHKOV, A.S.; ARBATSKY, N.P.; DEREVITSKAYA, V.A.; KOCHETKOV, N.K. Application of ^{13}C -n.m.r. spectroscopy in the structural study of complex hetero-oligosaccharides. Carbohydr. Res., 72:218-21, 1979.
104. SIMHA, D.B. Note on degradation kinetics. Arch. Biochem. Biophys., 53:515-8, 1954.
105. SMITH, D.B. & COOK, W.H. Fractionation of carrageenin. Arch. Biochem. Biophys., 45:232-3, 1953.
106. STAUB, A.M. Removal of proteins. Methods Carbohydr. Chem., 5:5-6, 1965.

107. STELLNER, K.; SAITO, H.; HAKOMORI, S. I. Determination of aminosugar linkages in glycolipids by methylation. Arch. Biochem. Biophys., 155:464-72, 1973.
108. STOFFYN, P. J. & JEANLOZ, R. W. Identification of amino sugars by paper chromatography. Arch. Biochem. Biophys., 52:373-9, 1954.
109. TAYLOR, & CONRAD, H. E. Stoichiometric depolymerization of polyuronides and glycosaminoglycuronans to monosaccharides following reduction of their carbodiimide-activated carboxyl groups. Biochemistry, 11 (8):1383-8, 1972.
110. TIMELL, T. E. Effects of substituents at C(5) on the acid hydrolysis of glycosides. Chem. Ind., 503-4, 1964.
111. _____. The acid hydrolysis of glycosides. I. General conditions and the effect of the nature of the aglycone. Can. J. Chem., 42:1456-72, 1964.
112. TIMELL, T. E.; ENTERMAN, W.; SPENCER, F.; SOLTES, E. J. The acid hydrolysis of glycosides. II. Effect of substituents at C-5. Can. J. Chem., 43:2296-304, 1965.
113. TREVELYAN, W. E.; PROCTER, D. P.; HARRISON, J. S. Detection of sugars on paper chromatograms. Nature, 166:444-5, 1950.
114. VASKOVSKY, V. E. & ISAY, S. V. Quantitative determination of formaldehyde liberated with periodate oxidation. Anal. Chem., 30:25-31, 1969.
115. WHISTLER, R. L. & RICHARDS, G. N. Uronic acid fragments from slash pine (*Pinus elliottii*) and their behavior in alkaline solution. J. Amer. Chem. Soc., 80:4888-91, 1958.